

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Einfluss von *cis*-regulatorischen Sequenzen auf die Expression des Herbizidresistenzgens *pat*

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl. Biol. Nadine Knöchel

Rostock, 2011

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0168-6

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Inge Broer
Universität Rostock
Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät
Agrobiotechnologie und Begleitforschung zur Bio- und Gentechnologie
Justus-von-Liebig-Weg 8
18059 Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Hehl
Technische Universität Braunschweig
Institut für Genetik - Biozentrum
Spielmannstr. 7
38106 Braunschweig

Eröffnungsdatum: 06.06.2011

Verteidigungsdatum: 14.11.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Zusammenfassung	v
A Einleitung	1
A1 Das Herbizidresistenzgen <i>pat</i>	1
A2 Regulation der Genexpression über <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen.....	3
A3 Stabilität der Transgenexpression	4
A4 Die systemische Ausbreitung des ‘Gene Silencing’	6
A5 Ziele der Arbeit	7
B Material und Methoden.....	8
B1 Material	8
B1.1 Bakterienstämme	8
B1.2 Plasmide.....	8
B1.3 Pflanzenspezies.....	8
B1.4 Medien	8
B1.5 Puffer und Lösungen.....	9
B1.6 Antikörper.....	12
B1.7 Oligonukleotide	12
B2 Methoden	13
B2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen	13
B2.2 Kultivierung von <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Solanum tuberosum</i>	13
B2.3 Blattscheibentransformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	14
B2.4 Versuch zur Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit	14
B2.5. Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA	14
B2.6 PCR-Analyse und PCR-Techniken.....	16
B2.7 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA	18
B2.8 Methoden zur Isolierung und Analyse von Proteinen	23
C Ergebnisse.....	26
C1 Einfluss <i>cis</i> -regulatorischer Sequenzen des Herbizidresistenzgens <i>pat</i> auf das mRNA- und Protein ‘steady state level’ unter optimalen Wachstumsbedingungen in Tabak.....	26
C1.1 Die verschiedenen 5´- und 3´- Bereiche des <i>pat</i> Gens verursachen starke Unterschiede im Expressionlevel bei 24°C	28
C1.2 Die Adaptation des Kodierbereichs an den Codongebrauch in Pflanzen führte zu einer signifikanten Steigerung des Pat Protein ‘steady state level’	32

C1.3	Die 5´ Region des <i>pat</i> Gens beeinflusst die Expression.....	34
C1.4	Die 5´ UTR41 scheint mit einer besseren Translationsrate verbunden zu sein als die 5´ UTRS	35
C1.5	Deletionen in der 3´ UTR führen zu Unterschieden im mRNA- und Protein- 'steady state level'	36
C1.6	Die verschiedenen Transkriptionsterminatoren verursachen signifikante Unterschiede im <i>pat</i> Expressionslevel	38
C1.7	Die Transkriptionsterminatoren sind mit einer unterschiedlichen Anzahl von 3´ Transkriptenden assoziiert.....	41
C1.8	Inter-Transformant-Variationen korrelieren nicht eindeutig mit der Kopienzahl des integrierten <i>pat</i> Transgens	45
C1.9	Einfluss der unterschiedlichen 5´- und 3´ UTRs der verschiedenen <i>pat</i> Gene auf die mRNA Stabilität	47
C2	Einfluss <i>cis</i> -regulatorischer Sequenzen des Herbizidresistenzgens <i>pat</i> auf das mRNA- und Protein 'steady state level' unter optimalen Wachstumsbedingungen in Kartoffel... 51	
C2.1	Verschiedene <i>pat</i> Genvarianten führen auch in Kartoffel zu signifikanten Unterschieden immRNA- und Protein 'steady state level'	51
C3	Einfluss <i>cis</i> -regulatorischer Sequenzen auf das <i>pat</i> -mRNA- und Protein 'steady state level' unter Hitzestressbedingungen in Tabak.....	56
C3.1	Der 5´ UTR41 im <i>pat</i> 44- und <i>pat</i> 50 Gen führt in einigen jedoch nicht allen Linien zu einer Reduktion des Pat Protein 'steady state level'	57
C3.2	Die 5´ verlängerte 3´ UTR im <i>pat</i> 45 Gen verursacht keine Transgeninaktivierung nach Hitzestress.....	59
C3.3	Der <i>nos</i> Terminator führt nur in einigen Linien zu einer Reduktion des Pat Proteins unter Hitzestressbedingungen	61
C3.4	In der Reaktion auf Hitzestress korreliert das mRNA 'steady state level' direkt mit dem Proteingehalt.....	63
C3.5	Der Hitzestress hat keinen signifikanten Einfluss auf die <i>pat</i> mRNA Stabilität....	64
C3.6	Analyse der Beteiligung kleiner RNAs an der Inaktivierung des <i>pat</i> Transgens unter Hitzestressbedingungen	66
C3.7	Unter Hitzestress inaktivierende <i>pat</i> Linien zeigen teilweise schon bei 24 °C eine vergleichsweise geringe Expression.....	68
C3.8	Die <i>pat</i> Expression unter Hitzestressbedingungen zeigt keine eindeutige Korrelation zur Kopienzahl	69
C4	Einfluss <i>cis</i> -regulatorischer Sequenzen auf das <i>pat</i> -mRNA- und Protein 'steady state level' unter Hitzestressbedingungen in Kartoffel	72
C4.1	Die einzelnen Genelemente haben in Kartoffel einen vergleichbaren Einfluss auf die Expression des <i>pat</i> Transgens unter Hitzestress.....	72
C4.2	In der Reaktion auf Hitzestress korreliert auch in Kartoffel das <i>pat</i> mRNA- direkt mit dem Protein 'steady state level'	72
C4.2	Der Hitzestress hat Einfluss auf die Länge der <i>pat</i> 40-Transkripte	73

C4.3	In Kartoffel gibt es ebenfalls keinen eindeutigen Einfluss der Kopienzahl auf die Reaktion auf moderatem Hitzestress	74
C5	Untersuchungen zur systemischen Ausbreitung des hitzeinduzierten Inaktivierungszustandes in Tabak	75
C5.1	Es gibt keine systemische Ausbreitung der Hitzestress-induzierten Transgeninaktivierung in <i>pat41</i> Linien.....	76
C5.2	Es gibt keine systemische Ausbreitung der Hitzestress-induzierten Transgeninaktivierung in <i>pat43</i> Linien.....	80
C5.3	Die Hitzestress-induzierte Transgeninaktivierung ist auf 37 °C-behandelte Pflanzenteile beschränkt	81
D	Diskussion.....	84
D1	Einfluss <i>cis</i> -regulatorischer DNA-Sequenzen auf das <i>pat</i> mRNA- und Protein ‘steady state level’ unter optimalen Temperatur-Bedingungen.....	84
D1.1	Hat die Kodierregion einen Einfluss auf die <i>pat</i> Expression?	84
D1.2	Hat die 5´ flankierende Region einen Einfluss auf die <i>pat</i> Expression?	85
D1.3	Wird die <i>pat</i> Expression von Veränderungen in der 3´ UTR Sequenz beeinflusst?...	89
D1.3.1	Haben die unterschiedlichen Transkriptionsterminatoren einen Einfluss auf die <i>pat</i> Expression?	90
D1.3.2	Beeinflusst der 5´ Bereich der 3´ UTR die <i>pat</i> Expression?	95
D2	Welche Faktoren beeinflussen die Inter-Transformant-Variabilität?	97
D3	Einfluss <i>cis</i> -regulatorischer DNA-Sequenzen auf das <i>pat</i> mRNA- und Protein ‘steady state level’ unter moderatem Hitzestress.....	100
D3.1	Warum sind definierte Standards zur Beurteilung der Reaktion auf moderaten Hitzestress notwendig?	100
D3.2	Warum verursacht die Kombination aus 5´ UTR41 und 3´ <i>nos</i> stets eine Inaktivierung der <i>pat</i> Expression, ihre alleinige Präsenz jedoch nicht?	101
D3.3	Warum wird die hitzeinduzierte Inaktivierung der <i>pat</i> Expression in der Pflanze nicht systemisch verbreitet?.....	106
D3.4	Warum verursacht die Kombination aus 5´ UTRS und 3´ <i>camv</i> stets eine Stabilität der <i>pat</i> Expression unter Hitzestress?	107
D3.5	Warum verursacht die 5´ UTRS unter Hitzestress häufig eine Zunahme der <i>pat</i> Expression?	108
D4	Wie ist die <i>pat</i> Expression in anderen Kulturarten reguliert?	110
D5	Ausblick	112
E	Literaturverzeichnis	113
F	Anhang	I
F1	Restriktionsschnittstellen und Bindestellen der <i>pat</i> spezifischen Sonden für die Southern Blot Analysen.....	I
F2	Sequenzen und Sequenzvergleiche	II

F2.1	Sequenzvergleich der in den <i>pat</i> -Konstrukten verwendeten CaMV 35S Promotorversionen	II
F2.2	Sequenzvergleich der <i>patS</i> - und <i>pat41</i> -Kodierregion	III
F2.3	Sequenzvergleich der verwendeten Transkriptionsterminatoren.....	IV
F3	Codon Usage des <i>pat41</i> -, <i>pat40</i> - und <i>pat43</i> -Kodierbereichs im Vergleich zum Kodierbereich endogener Tabak- und Kartoffelgene	V
F4	Datengesamtübersicht für Tabak zur <i>pat</i> -Expression unter normalen- und Hitzestressbedingungen.....	VI
F5	Datengesamtübersicht für Kartoffel zur <i>pat</i> -Expression unter normalen- und Hitzestressbedingungen.....	X
F6	Signifikanzanalysen.....	XI
F7	Abbildungsverzeichnis	XXI
F8	Tabellenverzeichnis	XXIII
F9	Abkürzungsverzeichnis.....	XXIV

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *cis*-regulatorischen Sequenzen auf die Expression des Phosphinothricinresistenzgens *pat* aus *Streptomyces viridochromogenes* in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen während einer Kultivierung bei 24 °C und unter moderatem Hitzestress von 37 °C untersucht.

Ausgangspunkt für die Analyse der *pat* Expression bei 24 °C war die Beobachtung, dass das *pat*OCA Gen mit einer deutlich stärkeren Expression verbunden ist als die *pat*41- und *pat*43 Gene, was auf die unterschiedlichen 5'- und 3' untranslatierten Regionen zurückzuführen war. Die Analyse von verschiedenen chimären *pat* Genen, in denen jeweils ein einzelnes Element des hochexprimierenden *pat*OCA Gens (5' UTRS, 3' UTRS, 3'*camv*) durch ein Element des gering exprimierenden *pat*41 Gens (5' UTR41, 3' UTR41, 3'*nos*) ausgetauscht wurde, zeigte, dass jedes einzelne Element die Expression bei 24 °C beeinflusst.

Die Verwendung des 3'*nos* anstelle des 3'*camv* reduzierte die Pat Proteinkonzentrationen um das 17-fache aufgrund von verringerten Transkriptions- und Translationsraten. Der 3'*ocs* führte sogar zu einer Reduktion um das 100-fache, die bereits auf mRNA-Ebene stattfand. Die Verwendung eines 3'*camv* Fragmentes in *antisense* Orientierung verursachte die schwächste Expression aller untersuchten *pat* Gene, was mit Abläufen während der Transkriptionstermination und Polyadenylierung assoziiert ist.

Der Austausch der 5' UTRS durch die 5' UTR41 führte zu einer 25-fachen Reduktion der Pat Gehalte, wobei die 5' UTRS sich günstiger auf die Transkription auswirkte, während die 5' UTR41 die Translationsrate förderte. Die Länge der zusätzlich zwischen Translationsstoppcodon und Transkriptionsterminator lokalisierten Sequenzen (3' UTR41 und 3' UTRS) korrelierten umgekehrt proportional zum *pat* mRNA 'steady state level'.

Schließlich bewirkte im Vergleich zur bakteriellen *pat*41 Kodierregion auch die codonoptimierte synthetische *pat*S Kodierregion aufgrund einer erhöhten Translationsrate eine mehr als 4-fache Steigerung der Pat Proteingehalte.

Ausgangspunkt für die Analyse der *pat* Expression bei 37 °C war die Beobachtung, dass alle *pat*OCA Linien unabhängig von Integrationsort, Kopienzahl und hemi- oder homozygoten Zustand das Transgen stabil exprimieren, während sämtliche *pat*41- und *pat*43 Linien einen Verlust der Phosphinothricinresistenz erkennen ließen. Ich konnte ermitteln, dass sich diese hitzeinduzierte Transgeninaktivierung ausschließlich auf die hitzebehandelten Teile der Pflanze beschränkte und sich nicht systemisch ausbreitete. Sie ist unabhängig vom GC Gehalt der Kodierregion, und von einer deutlichen Reduktion der *pat* mRNA 'steady state level'

begleitet. Während die 3' UTR die Stabilität der *pat* Expression nicht beeinflusste, war sowohl in Verbindung mit der 5' UTR41 als auch mit dem 3'*nos* in bis zu 28 % der Linien eine hitzeinduzierte Inaktivierung der *pat* Expression zu beobachten. Anders als in den *pat41*- und *pat43* Linien war das 'Gene Silencing' für einige Linien von der Kopienzahl und/oder vom Integrationsort abhängig, und fand auf transkriptioneller- oder auf posttranskriptioneller Ebene statt.

Ein 'Gene Silencing' in allen Linien eines Konstruktes trat nur auf, wenn 5' UTR41 und 3'*nos* gemeinsam vorlagen (*pat40*, *pat41*, *pat43*). Die Ursache liegt entweder in dem gemeinsamen Vorliegen beider *cis*-regulatorischer Sequenzen oder in der vorkommenden 'Inverted Repeat' Struktur homologer *nos* Terminatorsequenzen der beiden auf den T-DNAs lokalisierten Gene.

Die *pat* Expression bei 24 °C und bei moderatem Hitzestress fand gleichermaßen in Kartoffel statt, und lässt vermuten, dass die *pat* Expression allgemeinen Regulationsmechanismen der Pflanze unterliegt.

A Einleitung

A1 Das Herbizidresistenzgen *pat*

Herbizide (lat.: *herba* = Kraut, Gras) sind ein essenzieller Bestandteil der modernen Landwirtschaft und tragen signifikant zur heutigen Ökonomie der landwirtschaftlichen Produktion bei. Mit einem Umsatzanteil von 47 % (2001) sind Herbizide die wirtschaftlich wichtigsten Pflanzenschutzmittel (Seitz et al., 2003). Man unterscheidet dabei zwischen selektiven Herbiziden, die gegen bestimmte unerwünschte Pflanzen wirken und nicht selektiven Breitbandherbiziden, die unspezifisch wirken. Der Wirkstoff Glufosinat-Ammonium als Bestandteil verschiedener kommerzieller Herbizide wie BASTA® und LIBERTY® (Bayer CropScience) ist ein solches Breitbandherbizid. Er ist für nahezu alle Pflanzen toxisch, wodurch es zunächst nur im Voraufbau genutzt werden konnte. Als Glufosinat wird das Racemat aus D- und L-Phosphinothricin bezeichnet, von dem jedoch nur das L-Enantiomer die herbizide Wirkung besitzt (Manderscheid & Wild, 1986). Die Aufnahme geschieht hauptsächlich über die grünen Pflanzenteile und bewirkt dort eine Hemmung der Glutamin-Synthetase (Manderscheid & Wild, 1986). Dies führt zur Anreicherung von Ammonium im Blattgewebe der Pflanze (Köcher, 1983; Wild & Manderscheid, 1984; Wild et al., 1987) und weiterhin zu einem Mangel an Glutamin und anderen Aminosäuren. Dadurch kommt es zur Hemmung der Photosynthese (Köcher et al., 1983; Sauer et al., 1987), zu Chlorosen und letztendlich zum Absterben des Blattgewebes und schließlich der gesamten Pflanze (Tachibana et al., 1986; Sauer et al., 1987; Wild et al., 1987). Der Vorteil von Glufosinat liegt in seiner relativ schnellen biologischen Abbaubarkeit. Seine Halbwertszeit im Boden beträgt je nach klimatischen Bedingungen drei bis zwanzig Tage. Eine Anreicherung des Herbizids oder vorübergehend auftretender Abbauprodukte konnte nicht festgestellt werden (Tebbe, 1988; Smith, 1988).

Phosphinothricin (Pt) wurde erstmals 1971 von zwei unabhängigen Forschergruppen (Bayer et al., 1972; Kondo et al., 1973) als Bestandteil des Tripeptids Bialaphos bestehend aus den Aminosäuren Alanin und Phosphinothricin isoliert. Als Quelle dienten *Streptomyces hygroscopicus* und *S. viridochromogenes*, die neben Phosphinothricin auch das Enzym Phosphinothricin-N-Acetyltransferase synthetisieren. Dieses Enzym greift sehr früh in den Bialaphos-Biosyntheseweg ein, und acetyliert Phosphinothricin an der α -Aminogruppe in einer Acetyl-CoA abhängigen Reaktion in die nicht toxische Verbindung N-Acetyl-L-Phosphinothricin. Die Phosphinothricin-N-Acetyltransferase wird von den Resistenzgenen

bar (bialaphos resistance gene aus *S. hygroscopicus*; Thompson et al., 1987) und *pat* (Phosphinothricin-N-Acetyltransferase aus *S. viridochromogenes*; Strauch et al., 1988) kodiert.

Durch die Erzeugung Pt-resistenter Pflanzen wurde das Anwendungsspektrum für Glufosinat-haltige Breitbandherbizide vergrößert, indem nun auch ein Einsatz nach dem Auflaufen der Pt-resistenten Kulturpflanzen ermöglicht wurde (Dröge et al., 1992). Mithilfe der Gentechnik wurden bereits erfolgreich transgene Nutzpflanzen (u. a. Sojabohnen, Raps, Mais, Reis, Zuckerrüben) entwickelt, die mithilfe der selbst produzierten Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase über die Blätter aufgenommenes Glufosinat detoxifizieren können (Wohlleben et al., 1988; Dröge et al., 1992).

Um die Expression des bakteriellen *pat* Gens in Pflanzen zu ermöglichen, wurde der natürliche Kodierbereich aus *S. viridochromogenes* mit pflanzenspezifischen Transkriptions- und Translationssignalen fusioniert. Dieses *pat41* Gen konnte erfolgreich in Tabak exprimiert werden (Wohlleben et al., 1988; Broer, 1989). Alternativ wurde ein zweiter Weg verfolgt, bei dem ausgehend von der Aminosäuresequenz des Pat Proteins ein synthetischer Kodierbereich (*patS*) konstruiert wurde, der stärker an den Codongebrauch in Pflanzen angepasst ist (Eckes et al., 1989). Dabei wurde zum einen der GC-Gehalt von 69 % auf 49 % reduziert, und somit dem durchschnittlichen GC-Gehalt von endogenen Tabakgenen (43,5 %) angenähert (Suo et al., 2006). Zum anderen sind in der modifizierten Kodierregion vermehrt solche Basentriplets vorhanden, die in Pflanzen häufiger benutzt werden. Dadurch sollte eine Steigerung der Expression erreicht werden wie sie z. B. auch für die modifizierten *cry1Ab* Gene aus *Bacillus thuringiensis* beobachtet werden konnte (Perlak et al., 1991). Der *patS* Kodierbereich wurde ebenfalls mit pflanzenspezifischen, jedoch im Vergleich zum *pat41* Gen mit anderen Transkriptions- und Translationssignalen versehen. Das daraus resultierende *patOCA* Gen (Eckes et al., 1989) zeigte in Tabak tatsächlich eine höhere Expression (Köhne et al., 1998). Köhne et al. (1998) konnten jedoch mithilfe des chimären *pat43* Gens, das aus dem *patS* Kodierbereich und den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) des *pat41* Gens zusammengesetzt wurde, nachweisen, dass nicht die Anpassung des Kodierbereichs die höhere Expression verursachte. Stattdessen schienen die 5'- und 3'-UTR des *patOCA* Gens dafür verantwortlich zu sein.

Die Expression der drei Gene *pat41*, *pat43* und *patOCA* stand jeweils unter Kontrolle des Promotors der Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S RNA (35S Promotor; Gardner et al., 1981). In den *pat41*- und *pat43* Genen wurde ein 823 Basenpaare (bp) großes 35S Promotorfragment verwendet (Kriete et al., 1995), während im *patOCA* Gen der 35S Promotor im 5' Bereich um 289 bp auf 534 bp verkürzt wurde (Eckes et al., 1989). Die *pat41*-

und *pat43* Gene unterschieden sich zudem in ihren Transkriptionsterminator vom *patOCA* Gen, was ebenfalls das Expressionslevel beeinflussen könnte (Ingelbrecht et al., 1991). Das *patOCA* Gen enthält den Terminator der CaMV 35S RNA (3'*camv*; Pietzrak et al., 1986), während die anderen beiden Gene den der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens* (3'*nos*; Bevan et al., 1983) beinhalten. Da sich die *pat* Gene jedoch zusätzlich zu den unterschiedlich langen 35S Promotorfragmenten und den verschiedenen Terminatoren außerdem in ihren 5' UTRs und in die 3' UTR eingebrachten Sequenzen unterschieden, blieb ungeklärt, welche dieser *cis*-regulatorischen Sequenzen für das höhere Expressionsniveau des *patOCA* Gens verantwortlich ist.

A2 Regulation der Genexpression über *cis*-regulatorische Sequenzen

Cis-regulatorische Regionen kontrollieren verschiedene Schritte der Transgenexpression (Koziel et al., 1996). Die Regulation der Transkription erfolgt vornehmlich durch den Promotor eines Gens, an den die RNA Polymerase bindet. Es werden verschiedene Typen von Promotoren unterschieden. Konstitutive Promotoren, zu denen der häufig verwendete 35S Promotor gehört, sind in allen Geweben der Pflanze, gewebsspezifische Promotoren dagegen nur in bestimmten Geweben aktiv. Zusätzlich gibt es induzierbare Promotoren, die sich unter bestimmten Bedingungen wie z. B. Licht ein- und ausschalten lassen.

Die Transkriptionsrate wird zudem auch durch Transkriptionsterminatoren reguliert. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Termination der Transkription und Prozessierung reifer mRNA 3'-Enden. Viele Faktoren, die diese beiden Prozesse beeinflussen, haben ebenfalls einen Einfluss auf die Initiation der Transkription, sodass die Prozesse wahrscheinlich miteinander verbunden sind (Proudfoot, 2004). Zu den am häufigsten verwendeten Transkriptionsterminatoren in Pflanzen gehören der CaMV 35S Terminator (Pietzrak et al., 1986; Sanfaçon et al., 1991), sowie die Terminatoren der Nopalin- (Depicker et al., 1982; Bevan et al., 1983) und der Octopinsynthase (De Greve et al., 1982; MacDonald et al., 1991), die beide ursprünglich auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* lokalisiert sind.

Neben der Regulation der Transkription stellt die mRNA ein wichtiges Schlüsselmolekül für die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression dar. Die 5'-'Cap'-Struktur und der 3'-Poly(A)-Schwanz sind für die Stabilität und Translationsinitiation wichtige strukturelle Elemente eukaryotischer mRNAs. Sie schützen das mRNA Molekül vor dem Abbau durch Ribonukleasen (Gallie et al., 1991) und haben eine synergistische Funktion bei der Initiation der Translation vermutlich aufgrund von Protein-mRNA Interaktionen (Bailey-Serres, 1999).

Ferner spielt für die Initiation der Translation die Struktur der 5' UTR eine wichtige Rolle. Dazu zählen deren Länge und Sekundärstruktur, die Umgebung des Translationsstartcodons (AUG Kontext) und stromaufwärts liegende Offene Leserahmen (Kozak, 1991).

Die 3' UTR dagegen spielt v. a. für die Stabilität der mRNA eine wichtige Rolle. So wurden in der 3' UTR verschiedener mRNAs Sequenzmotive gefunden, die eine mRNA destabilisieren können. Dazu zählen z. B. AU-reiche Sequenzmotive in der 3' UTR von mRNAs, die für Protooncogene, Transkriptionsfaktoren und Cytokine kodieren (Ohme-Tagaki et al., 1993; Greenberg & Belasco, 1993) und die sogenannten 'Downstream' (DST) Elemente der *SAUR* Transkripte aus der Sojabohne (Newman et al., 1993). Auch das Phänomen der alternativen Polyadenylierung, d. h. das Anhängen von Adenin-Nukleotiden an unterschiedlichen Polyadenylierungsstellen in der 3' UTR, spielt eine wichtige Rolle in der Genexpression, indem es z. B. die mRNA Stabilität, Translatierbarkeit und Fähigkeit zur Proteinbildung beeinflusst (Lutz & Moreira, 2011).

A3 Stabilität der Transgenexpression

Für den Einsatz gentechnisch veränderter Kulturpflanzen ist die stabile Expression der integrierten Gene über lange Zeiträume und auch unter suboptimalen Umweltbedingungen essentiell. Nach der Transformation höherer Pflanzen konnte häufig eine hohe Variabilität in den Expressionsniveaus der eingebrachten Gene festgestellt werden. Diese konnte mit verschiedenen Faktoren in Verbindung gebracht werden, zu denen somaklonale Variationen, die Kopienzahl des Transgens, der Integrationsort des Transgens in das Pflanzengenom (Positionseffekt) und die Struktur der T-DNA selbst gehören (z. B. Jones et al., 1987; Dean et al., 1988; Peach & Velten, 1991). Durch die Fähigkeit dieser Faktoren eine Inaktivierung der Transgenexpression, sogenanntes 'Gene Silencing' auszulösen, kann das Expressionslevel herabgesetzt werden.

Das 'Gene Silencing' wurde erstmals in Petunien entdeckt, die ein chimäres Gen exprimieren, in dem ein starker konstitutiver Promotor mit der cDNA der Chalconsynthase fusioniert wurde (Napoli et al., 1990). Das Einbringen des Transgens führte nicht nur zu einer Inaktivierung des Transgens selbst, sondern inaktivierte auch eine identische, endogene Sequenz. Dieses Phänomen wird häufig als Cosuppression bezeichnet (z. B. Matzke & Matzke, 1993; Vaucheret et al., 1995; Palauqui et al., 1997).

Die Geninaktivierung beruht auf der Erkennung von homologen Sequenzen und kann auf zwei Ebenen erfolgen: transkriptional ('transcriptional gene silencing'; TGS), aufgrund der Blockierung der Transkription, und posttranskriptional ('posttranscriptional gene silencing';

PTGS), durch die Degradierung der RNA. Man geht davon aus, dass diese Mechanismen der Verteidigung der Pflanze dienen. So soll das im Kern stattfindende TGS einen Schutz vor transposablen Elementen darstellen (Ketting et al., 1999), während das im Cytoplasma lokalisierte PTGS der Abwehr von Viren dient (Ratcliff et al., 1997). In beiden Fällen konnte eine Beteiligung von doppelsträngiger (ds) RNA, sowie daraus generierten kleinen, nicht-kodierenden 'small interfering' RNAs (siRNAs) ermittelt werden (z. B. Matzke & Matzke, 1998; Fagard & Vaucheret, 2000; Sijen et al., 2001; Vaucheret und Fagard, 2001). Außerdem kann es in beiden Fällen zu einer Hypermethylierung der inaktivierten Gene kommen. TGS-inaktivierte Gene sind dabei in ihren Promotoren methyliert, während PTGS-inaktivierte Gene häufig eine Hypermethylierung in ihrer Kodierregion aufweisen (Grant, 1999; Kooter et al., 1999).

Neben dem Vorliegen von homologen Promotorsequenzen kann TGS häufig auch durch die Integration des Transgens in heterochromatische, hypermethylierte DNA-Regionen bedingt sein. Die Methylierung kann von der umgebenden DNA ausgehend auch auf das Transgen übergehen und es damit stilllegen (Pröls & Meyer, 1992; Park et al., 1996). Methylierungen können zu stabilen und vererbaren Geninaktivierungen führen (Chinnusamy & Zhu, 2009).

In der Vergangenheit wurde auch immer wieder ein Einfluss von äußeren, biotischen und abiotischen Faktoren auf die Transgenexpression in Pflanzen nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur das Silencing der *nia*, *nptII* und *luc* Transgene in Tabak (Palauqui & Vaucheret, 1995; Neumann et al., 1997; Conner et al., 1998), des *ltp2-gus* Transgens in Reis (Morino et al., 1999) und des *pat* Transgens in *Medicago sativa* (Walter et al., 1992) beeinflusst.

Köhne et al. (1998) wiesen auch in Tabak (*Nicotiana tabacum* SRI) einen Verlust der *pat*-vermittelten Phosphinothricinresistenz in *pat41*- und *pat43* Linien durch eine Temperatursteigerung von 24 °C auf 37 °C nach. Neumann et al. (1997) konnten zeigen, dass die Erhöhung der Temperatur auf 37 °C in Tabak eine leichte Hitzeschockantwort induziert. Die Hitzeschockantwort stellt eine umfassende Reprogrammierung der zellulären Aktivitäten zugunsten der Stressbewältigung dar. In deren Verlauf kommt es zur Translationsrepression von mRNAs nicht-essentieller Haushaltsgene, während Hitzeschockproteine bevorzugt translatiert werden (Nover et al., 1989; Gallie et al., 1995; Kedersha et al., 2005). Auch die Sensitivität der *pat43* Linien wurde scheinbar durch eine drastische Reduktion des Pat Proteins verursacht. In den *pat41* Pflanzen war jedoch bereits das *pat* mRNA 'steady state level' beeinflusst, sodass der Hitzestress hier bereits eine Beeinträchtigung der Transkription oder mRNA Stabilität induzierte. Im Gegensatz dazu blieb die Expression des *patOCA* Gens durch den Hitzestress unbeeinflusst (Köhne et al., 1998).

Köhne et al. (1998) vermuteten, dass die hitzeinduzierte *pat* Inaktivierung unabhängig vom Vorliegen homologer Sequenzen ist, da weder die Kopienzahl noch der hemi- oder homozygote Zustand des Transgens die Stabilität beeinflussten. Des Weiteren konnte in den hitzebehandelten *pat41* Pflanzen keine Zunahme im Methylierungsgrad des Transgens festgestellt werden (Neumann et al., 1997), eine Beobachtung, die dadurch gestützt wird, dass die Reaktion reversibel ist, wenn die Kultivierung zu normalen Temperaturen zurückkehrt. Stattdessen vermuteten Köhne et al. (1998), dass der deutlich höhere GC Gehalt der natürlichen *pat41* Kodierregion im Vergleich zum umgebenden, pflanzlichen Genom zur Inaktivierung des Transgens führte. Dieser Mechanismus wurde bereits häufig in der Literatur beschrieben, ist jedoch mit einer Methylierung des Transgens verbunden (Meyer et al., 1993; Elomaa et al., 1995). Für die hitzeinduzierte Inaktivierung der Expression des *pat43* Gens in Tabak wurde ein Einfluss der untranslatierten Regionen vermutet. Erste Ergebnisse deuteten an, dass die 5' UTR (bezeichnet als 5' UTR41) allein nicht in der Lage ist einen derartigen Inaktivierungsmechanismus zu induzieren (Kerbach, 1999). Daher wurde vermutet, dass die destabilisierende Wirkung vom 3'nos ausgeht, oder durch einen synergistischen Effekt der 5' UTR41 in Verbindung mit dem 3'nos verursacht wird. Der Mechanismus des hitzevermittelten 'Gene Silencing' blieb jedoch ungeklärt.

A4 Die systemische Ausbreitung des 'Gene Silencing'

Kerbach (1999) konnte zeigen, dass die 37 °C-Behandlung eines Blattes einer *pat41*- oder *pat43* Tabakpflanze ausgehend von diesem Blatt zu einer Ausbreitung des Inaktivierungsstatus des Transgens auch auf nicht hitzebehandelte Blätter führt. Da der Mechanismus zum posttranskriptionalen 'Gene Silencing' der Pflanze ursprünglich zur Abwehr von Viren dient, ist es nicht überraschend, dass bei einigen Transgenen ähnlich der Reaktion auf einen Virenbefall eine systemische Ausbreitung des Inaktivierungsstatus innerhalb der Pflanze beobachtet wird (z. B. Palauqui et al., 1997; Voinnet & Baulcombe, 1997; Voinnet et al., 1998). Die Vermittlung von Zelle zu Zelle erfolgt symplastisch über Plasmodesmen (Kooter et al., 1999), über längere Distanzen durch das Phloem (Voinnet et al., 1998). Lange Zeit war die Identität der eigentlichen Signalmoleküle ungeklärt. Da das Silencing jedoch stets sequenzspezifisch ist, wurde angenommen, dass RNAs daran beteiligt sind (Hamilton & Baulcombe, 1999; Lucas et al., 2001). In den letzten Jahren nehmen die Hinweise zu, dass die systemische Transgeninaktivierung durch siRNAs vermittelt wird (z. B. Yoo et al., 2004; Dunoyer et al., 2010).

Die 21 nt großen siRNAs werden durch eine RNase III-ähnliche Ribonuklease (Dicer) von langen dsRNAs generiert. Sie werden anschließend in einen Multi-Komponenten-Nuklease-Komplex (RISC) inkorporiert, den sie zur homologen Ziel-RNA leiten, wodurch der Abbau der RNA (z. B. Klahre et al., 2002) oder die Inhibierung der Translation induziert wird (Brodersen et al., 2008; Oka et al., 2010). Außerdem dienen siRNAs, die eine Basenpaarung mit der Ziel-RNA eingehen, als Primer für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) zur Produktion von dsRNA. Diese wird wiederum durch den Dicer in 24 bis 26 nt große, sekundäre siRNA prozessiert. Es wurde vermutet, dass die Verbreitung der systemischen Transgeninaktivierung von der Produktion sekundärer siRNAs abhängig ist (Himber et al., 2003). Dunoyer et al. (2010) konnten jedoch zeigen, dass alle Größenklassen von siRNAs über Pflanzengewebe hinweg über lange Distanzen transportiert werden können.

Neben siRNAs konnten auch die kleinen, nicht-translatierten 'microRNAs' (miRNAs) im Phloemsaft nachgewiesen werden. Die endogenen 19 bis 24 nt großen miRNAs werden von charakteristisch gefalteten Vorläufermolekülen durch Dicer-ähnliche Proteinen prozessiert. Ihre Funktion liegt ebenfalls in der Degradierung einer Ziel-mRNA oder Repression seiner Translation (Eulalio et al., 2007). Als Negativregulatoren der Genexpression in Eukaryoten regulieren sie meist Transkriptionsfaktoren, wodurch sie diverse Rollen in der Regulation von verschiedenen Entwicklungsprozessen haben (Guo et al., 2005; Wang et al., 2005). Für die Nährstoffmangel-induzierten miRNAs miR399 und miR395 konnte bereits ein Transport über das Phloem nachgewiesen werden (Pant et al., 2008; Buhtz et al., 2010).

A5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der 5'- und 3' *cis*-regulatorischen Elemente des *pat* Gens auf die Grundexpression des Gens und seine Regulation unter moderaten Hitze-stressbedingungen untersucht werden. Dazu wurden in Vorarbeit zu dieser Arbeit verschiedene chimäre *pat* Gene konstruiert und stabil in Tabak eingebracht, in denen jeweils ein einzelnes Element des stabilen und hochexprimierenden *pat*OCA Gens (5' UTRS, 3' UTRS, 3'*camv*) durch ein Element des instabilen und gering exprimierenden *pat*41 Gens (5' UTR41, 3' UTR41, 3'*nos*) ausgetauscht wurde. Dadurch sollten sowohl die an der Regulation beteiligten Elemente identifiziert als auch die Regulationsebene bestimmt werden. Exemplarisch sollte in *pat*41- und *pat*43-Pflanzen eine mögliche systemische Ausbreitung der temperaturvermittelten Geninaktivierung analysiert werden. Durch Untersuchung der *pat* Expression in einer zweiten Kulturart (Kartoffel) sollte untersucht werden, ob es sich um einen allgemeinen Regulationsmechanismus in Pflanzen handelt.

B Material und Methoden

B1 Material

B1.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendeter Bakterienstamm.

Bezeichnung	Wichtige Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	Sm ^r vir ⁺ , Δ T-DNA,	Hoekema et al., 1983

B1.2 Plasmide

Tabelle 2: Verwendeter Pflanzentransformationsvektor

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
pLHpat46	Sm ^r Sp ^r <i>pat46</i> : p35S ₅₃₄ - <i>patS'</i> - 3' <i>nos</i> <i>nptII</i> : p35S ₄₃₄ - <i>nptII'</i> - 3' <i>camv</i>	pLH9000- Derivat	Walter, 2002

B1.3 Pflanzenspezies

<i>Nicotiana tabacum</i> Petit Havanna SRI		Maliga et al., 1973
SRI/OCA	SRI transformiert durch LBA4404/pOCA/Ac	Köhne et al., 1998
SRI/16.40	SRI transformiert durch LBA4404/pIB16.40	Broer, I., 1989
SRI/16.41	SRI transformiert durch LBA4404/pIB16.41	Broer, I., 1989
SRI/16.43	SRI transformiert durch LBA4404/pSK16.43	Köhne et al., 1998
SRI/16.44	SRI transformiert durch LBA4404/pSKE2	Kerbach, 1999
SRI/16.45.1	SRI transformiert durch LBA4404/pSW45-1	Walter, 2001
SRI/16.45.2	SRI transformiert durch LBA4404/pSW45-2	Walter, 2001
SRI/16.46	SRI transformiert durch LBA4404/pLHpat46	diese Arbeit
SRI/16.49	SRI transformiert durch LBA4404/pLHpat49	Huckauf, 2006
SRI/16.50	SRI transformiert durch LBA4404/pLHpat50	Huckauf, 2006
SRI/16.51	SRI transformiert durch LBA4404/pLHpat51	Huckauf, 2006
<i>Solanum tuberosum</i> Sorte Albatros (NORIKA Nordring Kartoffelzucht GmbH, Groß Lüsewitz)		
Albatros/OCA	Albatros transformiert durch LBA4404/pOCA/Ac	Walter, 2001
Albatros/16.40	Albatros transformiert durch LBA4404/pIB16.40	Walter, 2001
Albatros/16.41	Albatros transformiert durch LBA4404/pIB16.41	
Albatros/16.43	Albatros transformiert durch LBA4404/pSK16.43	
Albatros/16.44	Albatros transformiert durch LBA4404/pSKE2	Walter, 2001
Albatros/16.45.2	Albatros transformiert durch LBA4404/pDH45-2	Walter, 2001

B1.4 Medien

B1.4.1 Medien für die Bakterienkultivierung

Luria Broth-Medium, LB: (nach Miller, 1972)	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 85 mM NaCl; pH 7,1; autoklavieren; dem Festmedium wurde 1,2 % (w/v) Agar zugesetzt
--	---

B1.4.2 Medien für die Pflanzenkultivierung

MS-Medium: 0,46 % (w/v) MS-Medium (Fertigmischung mit Vitaminen, Duchefa); 88 mM Saccharose; 0,72 % (w/v) Agar
(nach Murashige und Skoog, 1962) pH 5,7; autoklavieren; evtl. Antibiotika zugeben

LS-Medium: 0,44 % (w/v) LS-Medium (Fertigmischung mit Vitaminen; Duchefa);
(nach Linsmaier und Skoog, 1965; speziell für Tabak 88 mM Saccharose; 0,72 % (w/v) Agar
entwickeltes Medium) pH 5,7; autoklavieren; evtl. Antibiotika zugeben

B1.4.3 Flüssigmedium für mRNA-Halbwertszeitversuch

Flüssigmedium: 15 mM Saccharose; 1 mM KCl; 1 mM Pipes; 1 mM Natriumcitrat;
(Brinker et al. 2001) pH 6,5; zur Hemmung der Transkription 200 µg ml⁻¹ Actinomycin D
dazugeben (Klauff & Gruissem, 1991)

B1.4.4 Medien für die Transformation von *Nicotiana tabacum*

B5-Infektionsmedium: 3 M Ammoniumnitrat; 2,6 M MES; 88 mM Saccharose;
0,32 % (w/v) Gamborg B5 Medium (nach Gamborg et al., 1968)
pH 5,7; autoklavieren

ACB-Medium : 0,43 % (w/v) MS-Medium (Fertigmischung ohne Vitamine; Duchefa);
88 mM Saccharose; 0,68 % (w/v) Agarose, pH 5,7; autoklavieren;
als sterilfiltrierte Lösungen zusetzen:
2,6 M MES; 0,01 % (v/v) Gamborg B5-Vitamine; 0,01 % (v/v),
6-Benzylaminopurin ; 0,2 ‰ (v/v) Naphthylessigsäure; bei Bedarf
Antibiotika

B1.4.5 Antibiotikazusätze für Bakterien- und Pflanzenmedien

Tabelle 3: Antibiotikazusätze.

Antibiotikum	Konzentration der verwendeten Antibiotika in mg l ⁻¹	
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>N. tabacum</i>
Spectinomycin	100	-
Streptomycin	300	-
Cefotaxim	-	500
Kanamycin	100	100
L-Phosphinothricin	-	20

B1.5 Puffer und Lösungen

B1.5.1 Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung

TE-Puffer (1x): 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; autoklavieren

B1.5.2 Puffer für die DNA-Isolierung aus Pflanzen durch Schnellaufschluss

Aufschlusspuffer: 0,05 mM NaOH; 0,25 % (w/v) SDS

B1.5.3 Puffer und Lösungen für die Isolierung chromosomaler DNA aus Pflanzen nach Khanuja et al. (1999)

Extraktionspuffer: 100 mM Tris; 25 mM EDTA; 1,5 M NaCl; 2,5 % (w/v) CTAB
pH 8,0; autoklavieren; frisch dazugeben:
0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 1 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon)
Hoch-Salz-TE: 1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA
pH 8,0; autoklavieren

B1.5.4 Puffer und Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

TBE-Puffer (1x):	60 mM Tris/HCl; 80 mM Borsäure; 3 mM EDTA pH 8,2; autoklavieren
TAE-Puffer (50x):	40 mM Tris; 10 mM Natriumacetat; 2,5 mM EDTA pH 7,8 mit Eisessig einstellen; autoklavieren
6x Loading Dye:	0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) Xylencyanol; 60 % (w/v) Glycerin; 60 mM EDTA
Bromphenolblau (BPB):	50 % (w/v) Glycerin; 50 % (w/v) Elektrophoresepuffer; einige Körner Bromphenolblau

B1.5.5 Puffer für die DNA-Analyse mittels PCR

PCR-Puffer (10x):	500 mM KCl; 200 mM Tris/HCl; pH 8,0
-------------------	-------------------------------------

B1.5.6 Puffer für die enzymatische Restriktion von DNA

Restriktionspuffer (10x):	Fertigpuffer der Firmen NEB bzw. Fermentas
BSA (100x):	Fertigpuffer von NEB

B1.5.7 Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung und -Analyse

B1.5.7.1 Puffer für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Blattmaterial (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen)

RLT-Puffer:	Fertigpuffer (Qiagen); Zugabe von 1 % (w/v) β -Mercaptoethanol
RWI-Puffer:	Fertigpuffer (Qiagen)
RPE-Puffer:	Fertigpuffer (Qiagen); Zugabe von reinem Ethanol erforderlich
Lysis solution RP:	Fertigpuffer (Invitex)
Wash Buffer R1:	Fertigpuffer (Invitex)
Wash Buffer R2:	Fertigpuffer (Invitex)
Elution Buffer R:	Fertigpuffer (Invitex)

B1.5.7.2 TRIzol-Puffer für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Blattmaterial

TRIzolpuffer:	38 % (v/v) Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer (Sigma-Aldrich); 0,8 M Guanidinthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 3,34 % (v/v) Na-Acetat-Puffer; 5 % (v/v) Glycerin nicht autoklavieren; Lagerung bei 4°C
Na-Acetat-Puffer:	3 M Na-Acetat; pH 5,2 Essigsäure (100 %), nicht autoklavieren
High-Salt-Puffer:	1,2 M NaCl; 0,8 M Tri-Natrium-Citrat; autoklavieren

B1.5.7.3 Puffer für die elektrophoretische Auftrennung von RNA

Denaturierungspuffer:	56 % (v/v) Formamid; 18 % (v/v) Formaldehyd; 1 x MOPS; 13,4 % (v/v) Glycerin; 13,4 % (v/v) H ₂ O; 0,4 % (v/v) Ethidiumbromid
MOPS-Puffer (10x):	0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA pH 7,0; autoklavieren

B1.5.7.4 Puffer für Analyse von kleinen RNAs

0,5 M EDTA;	pH 8,0; autoklavieren
10 x TBE	0,89 M Tris-Base; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA, pH 8,3; autoklavieren
Loading-Puffer (Stock):	10 ml Formamid; 10 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol

B1.5.7.5 Puffer für den Transfer von RNA auf Membranen

SSC (10x):	1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumcitrat, pH 7,0; autoklavieren
SSC (2x)	0,3 M NaCl; 0,03 M Natriumcitrat, pH 7,0; autoklavieren

B1.5.7.6 Puffer für die Hybridisierung von RNAs mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

SSC (20 x): 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0; autoklavieren
 (Vor-) Hybridisierungslösung: 7 % (w/v) SDS; 50 mM Natriumphosphatpuffer; 2 % (w/v) Blocking Reagenz; 50 % (v/v) Formamid; 5 x SSC, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin

B1.5.7.7 Puffer für die Waschung und Detektion von Northern Blots

Waschlösung I: 2 x SSC; pH 7,0; autoklavieren; 0,1 % (v/v) SDS
 Waschlösung II: 0,1x SSC; pH 7,0; autoklavieren; 0,1 % (v/v) SDS
 Waschpuffer: 0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer 1
 Puffer 1: 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,0; autoklavieren
 Puffer 2: 2 % Blocking Reagenz in Puffer 1
 Puffer 3: 100 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 9,5; autoklavieren

B1.5.8 Puffer und Lösungen für die Isolierung und Analyse von Proteinen

B1.5.8.1 Puffer für die Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial

Proteinextraktionspuffer: 50 mM Tris pH 7,5; 0,25 M Saccharose; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM DTT; 2 mM PMSF; 30 µM Leupeptin

B1.5.8.2 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Laufpuffer (5x): 0,1 M Tris/HCl; 1,25 M Glycin; 0,5 % (w/v) SDS
 Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8; autoklavieren
 Sammelgel-Puffer: 1 M Tris/HCl; pH 6,8; autoklavieren
 Acrylamid-Mix (Roth): 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid
 Ladepuffer (4x): 0,4 % (v/v) Glycerin; 2,4 mM Tris/HCl; 0,02 % (w/v) SDS; pH 6,8 einstellen und 5 µl 0,1 % BPB dazugeben; direkt vor dem Gebrauch Zugabe von 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol

B1.5.8.3 Puffer für den Proteintransfer auf Membranen

Transferpuffer: 40 mM Tris/HCl; 40 mM Glycin; 0,01 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol

B1.5.8.4 Lösungen für die Coomassie-Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Fixierer: 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 40 % H₂O_{dest.}
 Färbelösung: 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 40 % H₂O_{dest.}; 0,5 g Brilliant Blue R250 (lila Farbstoff) oder Serva Blue G
 Entfärber: 20 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 70 % (v/v) H₂O_{dest.}

B1.5.8.5 Puffer und Lösungen für die Waschung und Hybridisierung von Western Blots

TBS (1x): 15 mM Tris/HCl; 0,1 M NaCl; pH 7,6
 TBSTween20 (1x): 15 mM Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 0,01 % (v/v) Tween 20; pH 7,6
 ECL-Lösung I: 2,5 mM Luminol; 400 µM P-Cumarsäure; 100 mM Tris-HCl pH 8,5
 ECL-Lösung II: 5,4 mM H₂O₂; 100 mM Tris-HCl pH 8,5

B1.5.8.6. Puffer für die Rehybridisierung von Western Blots

Stripping Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol

B1.5.9 Puffer und Lösungen für den Pat-ELISA

Die verschiedenen Lösungen sind als Fertiglösungen bereits im Pat-ELISA-Kit (Steffens biotechnische Analysen GmbH) enthalten.

B1.5.10 Puffer und Lösungen für den Pat-Enzymaktivitätstest

Pat- Extraktionspuffer: 0,5 M Tris/HCl; 0,4 mM EDTA; 0,3 mg/ml BSA; 0,1 mM PMSF;
0,2 mM DTT; 30 µM Leupeptin

B1.6 Antikörper

B1.6.1 Antikörper für den Nachweis spezifischer, Digoxigenin-hybridisierter RNAs

Anti-DIG-AP: Schaf-Antikörper gegen Digoxigenin, mit alkalischer
Phosphatase gekoppelt

B1.6.2 Antikörper für den Nachweis der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase

Anti-PAT 65D₁₄ polyklonaler Antikörper gegen die Phosphinothricin-*N*-
Acetyltransferase (Vinnemeier et al., 1995)

ECLTM Rabbit IgG, HRP sekundärer Kaninchen-Antikörper (aus Affe) , mit Meerrettich-
-Linked F(ab')₂ Fragment Peroxidase gekoppelt (GE Healthcare; Cat. No.: NA9340)

Anti-Rabbit IgG sekundärer Kaninchen-Antikörper (aus Ziege), mit alkalischer
(whole molecule)-AP Phosphatase gekoppelt (Sigma.Aldrich; Cat. No.: A3687)

B1.7 Oligonukleotide

B1.7.1 PCR-Primer für die Amplifizierung der *pat*-Gene

<i>patS</i> -Primer forward	5' — CCAGTTGAGATTAGGCCAGC — 3'
<i>patS</i> -Primer reverse	5' — TGGAGGAGCTGGCAACTCAA — 3'
<i>kpatS</i> forward1	5' — CGGAGAGGAGACCAGTTGAG — 3'
<i>kpatS</i> reverse2	5' — CTAAGTGGCCTTGGAGGAGC — 3'
<i>pat41</i> -Primer forward	5' — TAACAATGAGCCCAGAACG — 3'
<i>pat41</i> -Primer reverse	5' — TGAGCTGCAGTCAGGATCTGTGT — 3'
<i>kpat41</i> RT5'	5' — GGTCTGCGACATCGTCAATCACT — 3'
<i>kpat41</i> RT3'	5' — ATGGACTTCAGCAGGTGGGTGTA — 3'
<i>pat41</i> N forward	5' — ACTAACCAATGAGCCCAGAACGACG — 3'
<i>pat41</i> N reverse	5' — CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC — 3'
5-kod41-24 forward	5' — GATGCCTCTGCCGACAGTGGTCC — 3'
<i>patS</i> -3'fw	5' — TAGGCCAGTTACCCAGATCTG — 3'
OligodT ₂₁ A	5'—CGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA — 3'
OligodT ₂₁ G	5'—CGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG — 3'
OligodT ₂₁ C	5'— CGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTC — 3'

B1.7.2 PCR-Primer für die Amplifizierung des *actin1*-Gens (Liu et al., 2005)

5' <i>Nb</i> -actin1	5' — GCAACTGGGATGATATGGAGAA — 3'
3' <i>Nb</i> -actin1	5' — GTGCCTTTGCAATCCACATCTG — 3'

B1.7.3 PCR-Primer für die Amplifizierung des 18S rDNA-Gens

18S rRNA forward	5' — GGTCGCAAGGCTGAAACT T — 3'
18S rRNA reverse	5' — TTATTGCCTCAAACCTCC — 3'

B1.7.4 Oligonukleotide zur Herstellung eines RNA-Markers für die Analyse kleiner RNAs

<i>pat41</i> -20	5'— CTTCAAGAGCGTGGTCGCCG — 3'
<i>pat41</i> -25	5'— CAACGCCTACGACTGGACCGTCGAG — 3'
<i>pat41</i> -30	5'— CTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGGAG — 3'
<i>pat41</i> -40	5'— GTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCAACTTCCGTA — 3'

B2 Methoden

B2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Agrobacterium tumefaciens: bei 30°C in LB-Medium

B2.2 Kultivierung von *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum*

B2.2.1 Kulturbedingungen

Die Tabak- und Kartoffel-Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen in Pflanzencontainern mit LS- (Linsmeier & Skoog, 1965) bzw. MS-Medium (Linsmeier & Skoog, 1962) im Klimaschrank oder in Erde in einem Klimaraum kultiviert.

Klimaschrank Tag-Bedingungen: 16 h, 24°C; Nacht-Bedingungen: 8 h, 24°C

Klimaraum Tag-Bedingungen: 16 h, 24°C, 65 % Luftfeuchtigkeit

Nacht-Bedingungen: 8 h, 24°C, 65 % Luftfeuchtigkeit

Eine Subkultivierung der steril gewachsenen Pflanzen war alle 4-6 Wochen notwendig.

Den unsterilen Pflanzen wurde einmal wöchentlich Düngerkonzentrat (Hakaphos® Pflanzendünger von Compo: 4 g / l) dem Gießwasser zugesetzt.

B2.2.2 Überführung von Pflanzen aus der Sterilkultur in Erde

Von steril gewachsenen Tabakpflanzen wurde das die Wurzeln umgebende Medium vorsichtig entfernt, und die Sprosse anschließend in mit gut durchfeuchteter Erde gefüllte Pflanzentöpfe gesetzt und als Schutz gegen Austrocknung mit einem Plastikbecher bedeckt. Die Plastikbecher wurden in den folgenden Tagen immer weiter geöffnet, so dass sich die Pflanzen langsam an die geringere Luftfeuchtigkeit anpassen konnten.

B2.2.3 Stecklingsvermehrung

Sprosse mit 3-4 Blattständen wurden mit einem Skalpell abgeschnitten und sofort in einem Topf mit feuchter Erde platziert. Als Austrocknungsschutz wurden Plastikbecher über die Stecklinge gestülpt. Nach ca. 5 Tagen wurde begonnen die Plastikbecher immer mehr zu öffnen, so dass eine langsame Anpassung an die geringere Luftfeuchte möglich war.

B2.2.4 Oberflächensterilisation von Tabaksamen (modifiziert nach Dixon, 1985)

Eppendorfgefäß bis zur 500 µl Markierung mit Samen füllen

- Samen in 1ml H₂O aufnehmen und mit TritonX-100 (1 Tropfen auf 100ml) benetzen
- 5 min bei RT quellen lassen, gelegentlich schütteln
- 1ml einer gesättigten Calciumhypochlorid-Lösung zugeben
- 5 min inkubieren
- Lösungen abziehen, Samen gründlich mit sterilem H₂O waschen
- Samen auf MS-Festmedium im Licht keimen lassen

B2.2.5 Hitzebehandlung von *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum*

Die Hitzebehandlung an Tabak- und Kartoffelpflanzen erfolgte in einer Klimakammer bei konstanten 37 °C und einem Tagesrhythmus von 16 h Tag/8h Nacht. Die Hitzebehandlung einzelner Blätter einer Tabakpflanze erfolgte ebenfalls in einer Klimakammer, in deren Seitenwand runde Aussparungen eingeführt wurden durch die das Blatt geführt wurde. Um einen Wärmeverlust in der Klimakammer zu vermeiden wurde die Aussparung um das Blatt herum mit Alufolie abgedichtet.

B2.2.6 Überprüfung der Herbizid-Resistenz von transgenen Tabakpflanzen

Zur Untersuchung der Phosphinothricin-Wirkung auf Tabakpflanzen wurden 5 µl einer sterilen, wässrigen D,L-Pt-Lösung (10 mg ml⁻¹) auf eine Hälfte einer voll entwickelten Blattspreite getropft. Zur Kontrolle wurde die andere Hälfte des Blattes mit dem gleichen Volumen Wasser benetzt. An nichttransgenen Tabakpflanzen traten unter Phosphinothricin-Einwirkung nach 2 bis 3 Tagen erste Nekrosen auf.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Herbizid-Resistenz bestand in der Sprühapplikation des Herbizids BASTA. Die Applikation der sterilen, wässrigen BASTA®-Lösung (100 mg l^{-1}) erfolgte beispielsweise nach Aussaat und Auflaufen von Tabakkeimlingen in Erde.

B2.3 Blattscheibentransformation von *Nicotiana tabacum* (modifiziert nach Horsch et al., 1985)

Bei der im folgenden beschriebenen 'Leaf-Disk-Transformation' werden Blattscheiben mit entwaffneten, transgenen *A. tumefaciens*-Bakterien kokultiviert. Diese übertragen den auf dem binären Vektor zwischen der LB- und RB-Sequenz gelegenen DNA-Bereich aufgrund ihrer Vir-Funktionen in die Zellen des beim Zerschneiden verletzten Blattgewebes. Auf bisher ungeklärte Weise wird diese Fremd-DNA in die chromosomale DNA der Pflanze eingebaut. Durch Zugabe von bestimmten Hormonen wird die Proliferation angeregt, bei entsprechender Selektion vermehren sich dabei nur die transgenen Zellen zu Kalli, aus denen spontan Sprosse entstehen.

- junge Blätter von steril kultivierten Tabakpflanzen nacheinander von der Mittelrippe befreien und auf einer sterilen Glasplatte in ca. $1,5 \text{ cm}^2$ -große Stücke schneiden
- Blattscheiben in Petrischalen mit der Oberseite nach unten auf 10ml flüssiges B5-Infektionsmedium flotieren
- 20 μl einer *A. tumefaciens* üN-Kultur zugeben
- 2 bis-3 d im Dämmerlicht bei 25°C inkubieren
- Blattscheiben gründlich in sterilem H_2O waschen und überschüssige Flüssigkeit durch Abstreifen auf einer trockenen Petrischale entfernen
- Blattscheiben auf festes ACB-Medium mit Cefotaxim, Kanamycin und/oder Phosphinothricin legen
- Ausbildung von Sprossen aus den gebildeten Kalli erfolgt nach ca. 4 bis 6 Wochen
- Sprosse zum Bewurzeln in Pflanzencontainer mit MS-Festmedium (mit Cefotaxim, Kanamycin und/oder Phosphinothricin) umsetzen
- Wurzelbildung erfolgt nach 1 bis 2 Wochen

B2.4 Versuch zur Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit

Die Analyse der mRNA Halbwertszeit erfolgte nach dem Protokoll von Klaff & Gruissem (1991) an reifen Tabakblättern, die zuvor von den Tabakpflanzen abgetrennt wurden. Zur Hemmung der Transkription wurde Actinomycin D (ActD, $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Flüssigmedium; B1.4.3) eingesetzt. Nach 30minütiger Vorinkubation, welches als Zeitpunkt 0 definiert wurde, erfolgte die Probennahme an 8 definierten Zeitpunkten bei 0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2,5 h; 3,5 h; 5,5 h; 7,5 h und 9,5 h wurden die Blätter geerntet für eine anschließende RNA Isolation (siehe Punkt B2.7.2.).

Da für die Anzahl der Zeitpunkte nicht ausreichend vergleichbares Blattmaterial an einer Pflanze vorhanden ist, wurden mindestens 8 Klone einer Linie für die Analyse herangezogen. Um den Einfluss möglicher *pat* mRNA Variabilitäten zwischen den verschiedenen Klonen zu minimieren, wurde das Blatt, welches dem mit ActD behandelten Blatt gegenüberliegt, für den gleichen Zeitraum ohne ActD behandelt. Die ermittelten *pat* Transkriptmengen der verschiedenen Probezeitpunkte in den mit ActD behandelten Blättern wurden anschließend von denen ohne ActD abgezogen.

Die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR (siehe Punkt 2.8.11) unter Normalisierung mit der 18S cDNA.

Für den Einfluss des Hitzestresses auf die Stabilität der mRNA wurde von den Klonen jeweils ein drittes vergleichbares Blatt abgenommen und mit ActD bei 37°C bis zur Probennahme inkubiert. Die Transkriptmengen wurden anschließend ebenfalls von denen, die ohne ActD bei 24°C inkubiert wurden, abgezogen.

B2.5. Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA

B2.5.1 Isolierung von DNA aus Pflanzen durch Schnellaufschluss

- ca. 2 cm^2 Blattmaterial in ein Eppendorfgefäß einwiegen und in flüssigem Stickstoff gefrieren
- Pflanzenmaterial gefroren zermörsern
- 200 μl Pflanzenschnellaufschlusspuffer hinzufügen, gut vortexen
- 10 min kochen (102°C); sofort auf Eis lagern

- 5 µl des Überstand mit 20 µl H₂O_{dd} verdünnen
- 1 µl der Verdünnung für die PCR einsetzen

B2.5.2 DNA-Isolation für Pflanzen mit einem hohen Gehalt an sekundären Metaboliten (nach Khanuja et al., 1999)

- Zerkleinern von 3 g Blattmaterial (mörsern auf N₂) in ein 50 ml Falcon überführen
- Zugabe von 3 ml Extraktionspuffer und mischen (Vortex, Invertieren),
- Inkubation 1 – 2 h bei 60 °C im Wasserbad
- Zugabe von 3 ml Chloroform:Isoamylalkohl (24:1) und 5 min mischen durch Invertieren
- Zentrifugation für 10 min, RT, 4600 g/min
- Transfer der oberen Phase in ein neues 50 ml Falcon
- Mit 1,5 ml (0,5 V) ml 5 M NaCl versetzen und vorsichtig mischen durch Invertieren
- Mit 2,7 ml (0,6 V) Isopropanol versetzen, langsam und sorgfältig mischen / Invertieren bis keine Phasen mehr sichtbar sind und 1 h bei RT fällen
- Zentrifugation für 10 min, RT, 4600 g/min; Überstand verwerfen, Pellet mit 500 µl 80 % Ethanol (-20°C) versetzen und in ein 1,5 ml Eppi überführen; Zentrifugation für 10 min, RT, 16100 rcf
- Pellet 5 min trocknen (SpeedVac) und in 500 µl Hoch-Salz TE-Puffer lösen
- Zugabe von 20 µl RNase A; Inkubation 30 min 37 °C
- Zugabe von 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1); mischen durch Invertieren
- Zentrifugation für 10 min RT, 16100 rcf
- Transfer der oberen Phase in ein neues Eppi
- Zugabe von 2 Volumen kaltem 96 % Ethanol (-20 °C), mischen durch Invertieren
- Zentrifugation für 10 min RT, 16100 rcf
- Überstand verwerfen und Pellet mit 200 µl 80 % Ethanol (-20 °C) waschen
- Zentrifugation für 10 min RT, 16100 rcf
- Pellet trocken (SpeedVac) und in ca. 200 µl H₂O_{dd} lösen (evtl. über Nacht bei 4 °C)

B2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und zu identifizieren. Da die Agarose aufgrund ihrer Siebstruktur Poren aufweist, bestimmt die Agarosekonzentration die Größe der trennbaren DNA.

- Agarose 0,8 %ig in TAE-Elektrophoresepuffer (1x) einwiegen und durch Erhitzen lösen
- Agarosegel mit Ethidiumbromid (2 µl einer 10 mg ml⁻¹ EtBr-Lösung auf 100 ml Gellösung) versetzen und rührend mischen; nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C in eine Gelkammer gießen
- DNA-Proben je nach Volumen mit Bromphenolblau (BPB) versetzen
- Laufbedingungen: 30-90 min bei 80 V,
- nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Photodokumentation

B2.5.4 DNA-Restriktion für Southern

- 25 µl Ansatz; 25-50 µg DNA
- 2 µl 10x Puffer; 2 – 3 µl hochkonzentriertes Enzym (50-100 U µl⁻¹); Inkubation über Nacht
- Testgel: 0,8 % TAE- oder 0,8 % TBE-Agarosegel

B2.5.5 Kapillarblot für den Transfer chromosomaler DNA auf Nylonmembranen – Southern Blotting (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Die DNA wurde nach folgendem Protokoll in einem 1 % TBE-Agarosegel aufgetrennt und denaturiert:

- 25 µl Restriktionsansatz + 6 µl 6 x Loading Dye
- 1,5 µl Marker + 6 µl 6 x LoadingDye (DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled – Roche)
- Gelauf bei 60 – 90 V bis Bromphenolblaulauffront $\frac{2}{3}$ des Gels erreicht hat
- überschüssige Agarose abschneiden
- 10 min in 0,25 M HCl (2 ml 37 % HCl rauchend + 78 ml H₂O_{dd}) bis Farbumschlag sichtbar wird (blau → gelb); kurz in H₂O_{dd} spülen

- 0,5 h Denaturierung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH frisch dazugeben)
- 0,5 h Neutralisierung (1 M Tris, 2 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7,0)
- einmal für 5 min in 2 x SSC spülen (20 x SSC, 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0)

Die Gesamt-DNA wird mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Biodyne A 0,45 µm; VWR) geblottet. Während dieses Transfers bleibt die relative Position der DNA erhalten. Der Kapillarblot erfolgt analog zum Kapillarblot für den RNA-Transfer auf Nylonmembranen (siehe 2.8.6.) für ca. 16 Stunden. Es wird allerdings 20x SSC anstatt 10x SSC verwendet.

B2.5.6 Hybridisierung von DNA mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden sowie Chemilumineszenz-Detektion mit CDP-Star

Die nicht-radioaktive Hybridisierung der auf der Membran fixierten DNA mit sequenzspezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden erfolgt nach dem gleichen Protokoll wie die Hybridisierung von RNAs. Die Hybridisierungstemperatur beträgt allerdings 37 – 42 °C.

Die Membranen wurden mit der *patS*- bzw. *pat41*-Sonden hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Detektion erfolgt ebenfalls nach dem Protokoll der Detektion von Digoxigenin-hybridisierten RNAs mit CDP-Star.

B2.6 PCR-Analyse und PCR-Techniken

B2.6.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten über PCR (nach Herstellerangaben)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der von Mullis et al. (1987) entwickelten Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion in einem Reaktionsansatz, der sich aus einem Mastermix, einem Primerpaar und dem DNA-Template zusammensetzte.

Ansatz der Fragment-PCR:		PCR-Reaktion:	
Fermentas Mastermix (2 x)	5 µl (2 x)	5 min	95 °C
Primer A (sense)	1 µl (10 pmol)	1 min	95 °C
Primer B (antisense)	1 µl (10 pmol)	1 min	58 °C
Template-DNA	1 µl	1 min	72 °C
		} 37 Zyklen	

Als Primer dienten von der Firma Life Technologies synthetisierte Oligonukleotide (1.7.).

Die Amplifizierung erfolgte mit einem Personal Cyclyer von Biometra, einem Techne TC-412 oder einem iCyclyer von Bio-Rad.

B2.6.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels PCR (modifiziert nach Herstellerangaben)

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden können für den nicht-radioaktiven Nachweis spezifischer RNAs oder DNAs genutzt werden. Die als Hybridisierungsprobe nutzbare DNA kann während einer PCR durch die enzymatische Aktivität der Expand High Fidelity Polymerase generiert werden. In dieser modifizierten Form der PCR können durch das Enzym neben den normalen Basen auch solche, die kovalent mit Digoxigenin gekoppelt sind, in den entstehenden DNA-Strang eingebaut werden. Durch den Einbau der modifizierten Basen werden die neuen DNA-Stränge mit Digoxigenin markiert. Nach Hybridisierung der DIG-Sonden mit der entsprechenden RNA bzw. DNA können die hybridisierten Bereiche durch den Anti-DIG-Antikörper gebunden und über eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert werden.

- Ansatz für die DIG-PCR: 100 ng DNA-Template
5 µl DIG-markierter Nukleotidmix
5 µl Reaktionspuffer
0,75 µl Enzymmix
je 3 µl Primer des zu amplifizierenden DNA-Fragments
mit H₂O auf 50 µl auffüllen

Um den Einbau von Digoxigenin-markierten Nukleotiden zu kontrollieren, wird ein PCR-Ansatz ohne DIG-markierte Nucleotide durchgeführt. Die Effizienz der Digoxigenin-Markierung kann in einem Agarosegel durch das gleichzeitige Auftragen von Kontroll-Probe und DIG-markierter Probe überprüft werden. Nach erfolgreichem Einbau des Digoxigenins in die neusynthetisierte DNA, weist diese eine

nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbare Verlängerung auf. Sind die Signale von markierter Probe und unmarkierter Kontrolle gleich stark, so sollte für die Hybridisierung 1 µl Sonde/ml Hybridisierungslösung eingesetzt werden.

- PCR-Programm für die Digoxigenin- Markierung von DNA-Fragmenten:

5 min	95 °C	}	9 Zyklen
30 s	95 °C		
30 s	60 °C		
40 s	72 °C		
30 s	95 °C	}	31 Zyklen
30 s	60 °C		
40 s (+20)	72 °C		
7 min	72 °C		
∞	8 °C		

B2.6.3 Aufreinigung von DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (nach Herstellerangaben)

Dieses Reaktionskit erlaubt eine direkte Aufreinigung von PCR-Produkten wie z. B. DIG-markierten Sonden. Die QIAquick spin column hat eine 90 - 95 %ige Bindungskapazität für DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp -10 kb. Die Säulen können in Abhängigkeit vom pH-Wert (optimal: pH ≤ 7,5) maximal 10 µg DNA binden.

- aufzureinigende DNA-Probe mit 5 Vol. Buffer PB mischen
- QIAquick spin column auf 2 ml-Eppendorfgefäß setzen
- im Puffer aufgenommene DNA-Probe vollständig auf QIAquick spin column auftragen
- Zentrifugation: 1 min, 13000 rpm, RT; Durchfluss verwerfen
- 750 µl Buffer PE (6 ml Buffer PE vor Benutzung mit 24 ml 99,85 % EtOH versetzen) auf die Säule geben; Zentrifugation: 1 min, 13000 rpm, RT; Durchfluss verwerfen
- Zentrifugation wiederholen um Ethanol vollständig zu eliminieren: 1 min, 13000 rpm, RT
- Säule auf neues Eppendorfgefäß setzen
- Elution: mind. 30 µl Elution Buffer oder H₂O direkt auf die Säulenmatrix geben; wird für die Elution ein geringeres als das Ausgangsvolumen eingesetzt, ist eine Aufkonzentrierung der DNA möglich
- Zentrifugation: 1 min, 13000 rpm, RT

B2.6.4 Bestimmung der eingebauten Menge an DIG-dUTP in die DNA-Sonde mit Teststreifen (Roche; nach Herstellerangaben)

1 µl des Markierungsansatzes wird in 39 µl H₂O aufgenommen (die angenommene DNA-Konzentration im Markierungsansatz beträgt 40 µg ml⁻¹). Von dieser Verdünnung wird die folgende Verdünnungsreihe pipettiert:

Verdünnung	Ansatz / H ₂ O	Endkonzentration	
1:3,3	10 µl + 23 µl	300 pg µl ⁻¹	A
1:10	5 µl + 45 µl	100 pg µl ⁻¹	B
A: 1:10	5 µl + 45 µl	30 pg µl ⁻¹	C
B: 1:10	5 µl + 45 µl	10 pg µl ⁻¹	D
C: 1:10	5 µl + 45 µl	3 pg µl ⁻¹	E

Von jedem dieser Verdünnungsansätze wird 1 µl auf einen Teststreifen aufgetragen und 2 min an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgt der Nachweis des eingebauten DIG-dUTPs durch Farbreaktion. Dafür werden fünf 2ml-Eppendorfgefäße vorbereitet:

Nummer	Inhalt	Inkubationszeit
1	2 ml Blocking Solution (P2)	2 min
2	2 ml Antikörperlösung (1:2000) in P2	3 min
3	2 ml Maleinsäurepuffer (P1)	1 min
4	2 ml Detektionspuffer (P3)	1 min
5	2 ml Färbelösung	5-30 min

Die Teststreifen werden jeweils zusammen mit dem Kontrollstreifen in die entsprechenden Lösungen gehalten. Die Reihenfolge ist: 1-2-1-3-4-5. Vor dem Eintauchen in eine neue Lösung werden die Filterstreifen aus einem Papiertuch abgetropft. Die Farbreaktion wird durch Schwenken der Teststreifen in Wasser abgestoppt. Die Streifen werden im Dunkeln auf Whatman Papier getrocknet. Die Auswertung erfolgt wie in folgendem Beispiel: Verdünnung D stimmt mit der Konzentration des Kontrollstreifens überein. Somit beträgt die Konzentration in Verdünnung D 3 pg/μl. Die Sonde ist 1:4000 verdünnt worden um die Konzentration D zu erreichen:

aus Original-Sondenlösung: 1 : 40

aus Originalverdünnung: 1 . 10 = Lösung B

aus Lösung B: 1 : 10 = Lösung D

Unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte errechnet sich eine Konzentration der markierten Sonde in der Originallösung von 12 ng μl⁻¹.

Die DIG-markierten DNA-Sonden für Northern- und Southern-Hybridisierungen wurden mit einer Endkonzentration von 20 ng ml⁻¹ in Churchpuffer angesetzt.

B2.7 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA

B2.7.1 Isolierung der Gesamt-RNA mit dem Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (modifiziert nach Herstellerangaben)

Dieses Reaktionskit ermöglicht die schnelle und einfache Isolierung der Gesamt-RNA (>200 nt) aus geringen Mengen Blattmaterial. Niedermolekulare RNAs (z.B. 5,8S-rRNA oder tRNAs) binden jedoch nicht quantitativ.

- 90 –100 mg Blattmaterial in ein Eppendorfgefäß einwiegen und in flüssigem N₂ gefrieren
- Pflanzenmaterial gefroren zermörsern
- Zugabe von 460 μl RLT-Puffer (vorher mit 10 μl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT-Puffer versetzen), 30 min vortexen
- 3 min bei 56 °C inkubieren, um das Blattgewebe zu zerstören
- gesamtes Lysat auf QIAshredder-Säule überführen; Zentrifugation: 2 min, 13000 rpm, RT
- Durchfluss in ein neues Eppendorfgefäß überführen und mit 0,5 Volumen Ethanol (99,85 %) mischen
- gesamte Probe auf RNeasy mini spin-Säule geben
- 2 min bei RT inkubieren, zwecks Bindung der RNA an die Säule; Zentrifugation: 1 min, 12000 rpm, RT; Durchfluss verwerfen
- zur Waschung der Membran 700 μl RWI-Puffer zugeben, dann 5 min bei RT inkubieren
- Zentrifugation: 1 min, 12000 rpm, RT; Säule auf neues Eppendorfgefäß setzen
- Zugabe von 500 μl RPE-Puffer; Zentrifugation: 1 min, 12000 rpm, RT; Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 500 μl RPE-Puffer; Zentrifugation: 2 min, 13000 rpm, RT; bis Membran trocken ist
- Säule auf neues Reaktionsgefäß setzen
- Zugabe von 35 μl RNase freiem Wasser, anschließend 10 min bei RT inkubieren
- Zentrifugation: 1 min, 12000 rpm, RT zur Elution der RNA
- Elution mit 35 μl RNase freiem Wasser einmal wiederholen
- Die eluierte RNA kann bei -20°C oder -80°C gelagert und für Northern Blot Experimente oder für (q)RT-PCR-Analysen eingesetzt werden.

B2.7.2 RNA-Isolation mit TRIzol-Puffer (Life Technologies)

- 100 mg Blattmaterial in 2ml Eppendorfgefäß einwiegen und auf flüssig N₂ zermörsern
- in 1,3 ml TRIzolpuffer aufnehmen
- vortexen bis sich das Pflanzenpulver gelöst hat und 10 min schütteln bei RT
- Zugabe von 250 μl Chloroform; vortexen; 10 min schütteln bei RT
- bei 13000-15000 rpm 30 min bei 4 °C zentrifugieren
- 900 μl Überstand in 1,5 ml Eppi überführen
- Zugabe von 325 μl High-Salt-Puffer
- Zugabe von 325 μl 2-Propanol
- Invertieren
- Fällung 10 min RT

- bei 13000-15000 rpm 15 min bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand verwerfen; Pellet in 250 µl EtOH abs. 70 % waschen
- bei 13000-15000 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet 5 min lufttrocknen lassen
- in 30-50 µl H₂O lösen; 10 min 65 °C
- vortexen, dann Lagerung auf N₂, anschließend Lagerung bei -80 °C

B2.7.3 Isolation kleiner RNAs nach Fulneček (2007)

- 1g Blattmaterial auf Stickstoff zermörsern und in 4 ml TRIzol (LifeTechnologies) homogenisieren
- optional: Homogenat für 10 min bei 4°C (12.000 x g) zentrifugieren zur Entfernung unlöslichen Materials (Fette, Proteine, Polysaccharide) → Überstand in neues Eppi
- Homogenat bei Raumtemperatur 5 min inkubieren (Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen)
- 800 µl Chloroform zufügen – 15 s stark schütteln (gründliches Mischen wichtig für anschließende Phasentrennung)
- 2-3 min bei Raumtemperatur inkubieren; 15 min, 4 °C, 12.000 x g zentrifugieren
- 600 µl der oberen wässrigen Phase in neues Eppi überführen
- Zugabe von 500 µl Isopropanol – gründlich mischen durch Vortexen
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren – 10 min, 4 °C, 12.000 x g zentrifugieren
- Überstand vorsichtig absaugen und verwerfen (RNA als weißes Pellet)
- Waschen mit 1 ml 75 % Ethanol – 5 min, 4 °C, 7500 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet kurz an der Luft trocknen
- Pellet in 100 µl TE lösen bei 65 °C (schnelleres Lösen und Dissoziation von der DNA); anschließend auf Eis
- Zugabe von PEG 8000 (Polyethylenglycol, MW=8000) auf 5 % Endkonzentration
- Zugabe von NaCl auf 0,5 M Endkonzentration (+12 µl 5M NaCl); gut mischen und 30 min auf Eis
- 10 min, 4 °C, 10.000 x g zentrifugieren (Entfernung der high molecular weight RNAs und der genomischen DNA)
- Überstand von 4 Eppis (ca. 500 µl) in neues Eppi (2ml) überführen
- Zugabe von 3 vol 96 % Ethanol – Fällung bei -20 °C für mind. 2 h / üN
- 10 min, 10.000 x g zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet mit 75 % Ethanol waschen und anschließend lufttrocknen
- Pellet in 50 µl Formamid lösen
- RNA messen, 50 – 100 µg RNA für Northern Blot einsetzen

B2.7.4 RNA-Agarosegelelektrophorese (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Mit Hilfe dieser Methode können RNA-Extrakte unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

- SeaKem® LE Agarose 1,4 %ig in 85 ml H₂O und 10 ml 10 x MOPS-Puffer einwiegen und rührend aufkochen
- Gel auf ca. 60 °C abkühlen lassen, mit 5,5 ml Formaldehyd mischen, dann sofort in eine Gelkammer gießen
- Gelkammer nach dem Erstarren des Gels in eine Laufkammer überführen und das Gel mit 1x MOPS-Puffer überschichten
- Probenvorbereitung: 1 - 20 µg RNA mit 12,5 µl Denaturierungspuffer inkl. Ethidiumbromid versetzen
- Proben für 30 min bei 65 °C denaturieren, sofort auf Eis, anschließend Probenauftrag
- Laufbedingungen: 60 – 80 V, 1 - 1,5 h
- Geldokumentation
- bei RNA-Gelen, die anschließend auf eine Nylonmembran geblottet werden, erwies sich die Auftragung eines Größenstandards (RNA Molecular Weight Marker III DIG-labeled, Roche) in verschiedenen Volumina (z. B. 1 µl, 2 µl, 3 µl) als günstig
- der DIG-markierte RNA MW Marker wird für den Auftrag 1:3 mit Denaturierungspuffer verdünnt und anschließend für 10 min bei 65 °C denaturiert

B2.7.5 Polyacrylamidgelelektrophorese für Analyse von Oligonukleotiden

Ansatz eines 15 % Acrylamid/Urea-Gels (optimal für Auflösung von 18-30mer Oligos) (50 ml: 1,5 mm dick) in einem Becherglas:

- 18,7 ml 40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)
- 24 g Urea (Harnstoff)
- 5 ml 10 x TBE-Puffer
- auf 37 °C erwärmen bis das Urea gelöst ist
- 6,3 ml A. dest. hinzufügen auf 50 ml Gesamtvolumen; Mischen durch Rühren
- Lösung 5 min auf Eis stellen, damit nach Zugabe von APS und TEMED nicht zu schnell auspolymerisiert
- 250 µl 10 % APS
- 25 µl TEMED
- mischen und sofort gießen unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen
- Kamm stecken und Gel ca. 30 - 45 min auspolymerisieren lassen
- Gel 15 – 30 min vorlaufen lassen und Geltaschen mit 1 x TBE ausspülen

Probenvorbereitung:

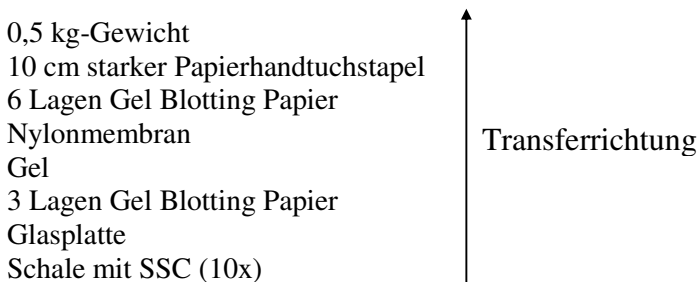
- pro Spur 50 bis 100 µg kleine RNAs auftrennen
- RNA in ca. 20 µl Loading-Puffer (für kleine RNAs) aufnehmen
- 5 min bei 65 °C erhitzen; auf Eis; aufs Gel laden

Elektrophorese und Blotten:

- Gelkammer zu einem Drittel mit 1 x TBE-Puffer füllen
- Gel 20 - 30 min bei 50 V laufen lassen bis beide Farbstoffe ins Gel gelaufen sind, dann Taschen ausspülen zur Entfernung der high molecular RNAs; sRNAs befinden sich im Bereich zwischen Xylencyanol und Bromphenolblau
- Gel laufen lassen bei 100 - 150 V üN bis Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hat

B2.7.6 Kapillarblot für den RNA-Transfer auf Nylonmembranen (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA in einem denaturierenden Agarosegel wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Biodyne A 0,45 µm; Pall Corporation) geblottet. Während dieses Transfers bleibt die relative Position der RNA erhalten. Der Kapillarblot erfolgt mit Hilfe des folgenden Transferaufbaus für ca. 16 Stunden:



- Da die unteren 3 Lagen Gel Blotting Papier mit der Flüssigkeit in Kontakt stehen, wird ein steter Strom von SSC von unten nach oben gewährleistet.
- Nach Beendigung des Transfers Membran kurz in SSC (2x) waschen und anschließend 1h bei RT trocknen.
- Membran in Folie einwickeln und zur Fixierung der RNA für 3min mit UV-Licht bestrahlen.
- Der Filter kann dann sofort hybridisiert oder in Folie eingewickelt aufbewahrt werden.

B2.7.7 Kapillarblot für den Transfer kleiner RNAs auf Nylonmembranen

- Gel in 20 x SSC äquilibrieren
- Membran (Hybond N, GE Healthcare) auf Gelgröße zuschneiden und in 20 x SSC befeuchten
- Northern Blot s. o. aufbauen und Gel üN blotten
- Blot abbauen, Membran trocknen und UV-crosslinking (3 min)

B2.7.8 Hybridisierung von RNAs mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (modifiziert nach Herstellerangaben)

Die nicht-radioaktive Hybridisierung der auf der Membran fixierten RNA mit sequenzspezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden ermöglicht eine Detektion spezifischer RNAs. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungsröhrchen in einem Hybridisierungssofen:

- Vorhybridisierung: 2 - 3 h in 20 ml / 100 cm² Church-Puffer bei 51 °C in Hybridisierungsröhrchen
- Hybridisierung: ü.N. in 10 ml / 100 cm² Church-Puffer versetzt mit 20 ng/ml frisch denaturierter DIG-DNA-Sonde (10 min bei >68°C) in Hybridisierungsröhrchen bei 51 °C

Die Membranen wurden zum Teil sowohl mit der *patS*-(bzw. *pat41*-)Sonde als auch mit der *Actin*-Sonde hybridisiert. Bei dem *Actin1* Gen handelt es sich um ein konstant exprimiertes Haushaltsgen. Dadurch ermöglicht die *Actin*-Bande den Vergleich der aufgetragenen Mengen zwischen den einzelnen Spuren. Auch eine zweite Hybridisierung mit der DIG-markierten 18S rDNA-Sonde im Anschluss ermöglichte einen Abgleich der aufgetragenen RNA-Mengen.

B2.7.9 Chemilumineszenz-Detektion von Digoxigenin-hybridisierten RNAs mit CDP-Star (modifiziert nach Herstellerangaben)

Diese Methode erlaubt den Nachweis spezifischer Digoxigenin-markierter RNAs über eine Chemilumineszenz-Reaktion. Die spezifische Digoxigenin-markierte Sonde kann durch einen hochaffinen, Enzym-gekoppelten Antikörper (Anti-DIG-AP) gebunden werden. Die gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Dephosphorylierung des Chemilumineszenz-Substrats CDP-Star zu einem metastabilen Zwischenprodukt, welches nach Zerfall Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert und dadurch einen Film belichtet. Alle Waschungen und Schritte der Detektion erfolgen in Hybridisierungsröhrchen.

Waschungen:

- 2 x kurz mit 2 x SSC + 0,1 % SDS vorspülen, 2 x 15 min bei RT waschen
- 2 x kurz mit 0,1 x SSC + 0,1 % SDS (vorgewärmt auf 68 °C) vorspülen, 2 x 20min bei 68 °C waschen (stringente Waschung)

Detektion:

- 2 - 4min in ausreichend Puffer 1 bei RT waschen
- 1 h in Puffer 2 bei RT blockieren
- 30 min in Puffer 2 + Anti-DIG-AP (Anti-DIG-AP vor Benutzung zentrifugieren: 5 min, 13000 rpm, RT; dann 1:20000 in Puffer 2 verdünnen) bei RT inkubieren
- 2 x kurz mit Waschpuffer vorspülen, 2 x 20min bei RT waschen
- 4 min in Puffer 3 bei RT äquilibrieren
- Membran zwischen zwei sterile Folien (z.B. Kopierfolie) legen
- Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star gleichmäßig auf der Membran verteilen (ca. 1ml CDP-Star/ 100 cm² Membran); 5min bei RT inkubieren
- Membran zwischen Frischhaltefolie legen und großzügig ausschneiden, in Filmkassette kleben
- Film (Kodak, BioMaxTM ML von Sigma) im Dunkeln auflegen
- 60 – 90 min Exposition bei RT, Exposition kann je nach Signalstärke wiederholt werden, da die Lumineszenz mindestens 24 h anhält und die Signalintensität während der ersten Stunden ansteigt

B2.7.10 Hybridisierung von kleinen RNAs mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und Chemilumineszenz-Detektion

Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten wie unter 2.7.8. angegeben mit dem Unterschied, dass die Hybridisierungstemperatur auf 30 °C verringert und die Zeit auf bis zu 3 Tage verlängert wurde. Die Detektion erfolgte wie unter 2.7.9. angeführt, mit dem Unterschied, dass die DNA-Sonde nur 2 x bei 30 °C abgewaschen wurde. Es erfolgte keine stringente Waschung.

B2.7.11 Quantifizierung der mRNA Gehalte mittels real-time RT-PCR

B2.7.11.1 cDNA-Synthese mit dem RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

DNase Behandlung: 2 µg RNA; 2 µl 10 x Reaktionspuffer + MgCl₂; DEPC-H₂O ad 18 µl
 2 µl DNase I (10 U µl⁻¹): 37 °C, 30 min bis 1 h;
 Abstoppen: Ansatz + 2 µl 25 mM EDTA; 65 °C, 10 min

cDNA-Synthese: dem 11 µl DNase-Behandlungs-Ansatz 1 µl OligodT-Primer zugeben
70 °C, 5 min; Überführung sofort auf Eis
Zugabe von 4 µl Reaktionspuffer (5x), 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor und
2 µl dNTP-Mix (10 mM)
37 °C; 5 min
Zugabe 1 µl Reverse Transkriptase (200 U µl⁻¹); 42 °C, 60 min
Abstoppen: 70 °C; 10 min

bei der anschließenden PCR mit der cDNA als Template sollten die Primer 1:100 verdünnt eingesetzt werden.

B2.7.11.2 Real-time RT-PCR zur Quantifizierung der mRNA-Gehalte

Mittels RT-PCR wurden zunächst die optimalen PCR-Bedingungen (Primerzusammensetzung, Zeit- und Temperaturbedingungen der PCR-Schritte, Verdünnungen des cDNA Templates) bestimmt. Die real-time RT-PCR erfolgte mit dem Bio-Rad iQ™5 Detection System. Dazu wurde die cDNA 1:50 verdünnt und jeweils 5 µl in einen 20 µl Ansatz mit 3,8 µl H₂O, je 0,6 µl Primer und 10 µl 2x iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) eingesetzt. Für die Amplifizierung der *patS* cDNA wurde die Primerkombination *kpatS* forward1 und *kpatS* reverse2; für die Amplifizierung der *pat41* cDNA die Kombination: *kpat41* RT5 und *kpat41* RT3 verwendet. Die Normalisierung erfolgte mit dem internen Referenzgen *actin1*, das mittels der Primerkombination 5'*Nb*-actin1 und 3'*Nb*-actin1 (Liu et al., 2005) amplifiziert wurde.

Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

- | | | |
|---------------------------|-------------------|-------------|
| ▪ Initiale Denaturierung: | 95 °C; 15 min | } 36 Zyklen |
| ▪ Denaturierung: | 95 °C; 30 s | |
| ▪ Annealing: | 58 °C; 1 min | |
| ▪ Extension: | 72 °C; 1 min 30 s | |

Es erfolgte jeweils eine 3-fach Bestimmung. Die Auswertung erfolgte mit der Bio-Rad iQ™5 Optical System Software Version 2.0. Zur Berechnung der mRNA-Gehalte wurden die Anzahl der Zyklen bei den automatisch gelegten Threshold (C_T -Wert, im linearen Bereich) verwendet. Da kein Standard verwendet wurde, wurde auf jeder 96-well-PCR-Platte die gleiche Probe mitgeführt und bei der Berechnung berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte mit der $2^{-\Delta C_T}$ -Methode (Schmittgen & Zakrajsek, 2000), bei der die C_T -Werte für *actin1* jeweils von denen für *pat* abgezogen wurden und anschließend der Wert in die Gleichung $2^{-\Delta C_T}$ eingesetzt wurden.

Für die Bestimmung der Hitzestabilität der mRNA erfolgte die Berechnung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001), hierbei wird zunächst der C_T -Wert für *pat* vom C_T -Wert für die *actin1* abgezogen (ΔC_T), die beiden ΔC_T -Werte der 24 °C (Kontrolle)- und 37 °C (Hitze)-Probe anschließend voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) und in die Gleichung n -fache Expression (Kontrolle zu Hitze) = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Ein Wert um 1 gibt die Stabilität der RNA unter Hitzebedingungen wider; ein Wert unter 0,5 zeigt eine Abnahme und ein Wert über 2 eine Zunahme der *pat* RNA nach Hitzestress an.

Für die Bestimmung der mRNA-Halbwertszeiten wurde der Maxima® SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix (2x) von Fermentas analog zu dem von Bio-Rad verwendet. Als interner Standard diente hier das 18S rRNA Gen, das mit der Primerkombination 18S rRNA forward und -reverse amplifiziert wurde. Zur Berechnung wurden hier Emissionswerte eines definierten PCR Zyklus herangezogen, bei denen sich die PCR Reaktion im linearen Bereich befinden. Für die 18S rRNA wurde Zyklus 17 ausgewählt, für die *pat* RNA variierte die Zykluszahl in Abhängigkeit von der Grundexpression zwischen 19 Zyklen für *patOCA* und 28 Zyklen für *pat51*. Mithilfe einer Regressionsanalyse wurde schließlich die Halbwertszeit der *pat* mRNA in den analysierten Pflanzen berechnet.

B2.7.12 Bestimmung der mRNA 3' Enden mittels RT-PCR

Für die Bestimmung der verwendeten Polyadenylierungsstellen / Cleavage Sites wurden verschiedene *pat*-cDNA-Proben mittels RT-PCR unter Benutzung des *patS*-3' forward bzw. *pat41*-20 forward Primers amplifiziert, der im *patS*-Kodierbereich direkt 5' des TGA Stopcodons bzw. im *pat41* Kodierbereich bindet. Als reverse Primer wurde ein Gemisch aus den drei OligodT₂₁-Primern mit der Sequenz 5'-CGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA/C/G-3' eingesetzt. Jeweils die letzte Base am

3' Terminus soll gewährleisten, dass der Primer am 5' Terminus des Poly(A)-Schwanzes bindet. Die Größe der erwarteten PCR-Fragmente lag in einem Bereich von 200 bis 350 bp, und wurden in einem 4 % (w/v) Agarosegel (in 1 x TBE-Puffer) aufgetrennt. Durch Abschätzung der Fragmentgrößen wurde die Identifizierung der verwendeten CS ermöglicht.

B2.8 Methoden zur Isolierung und Analyse von Proteinen

B2.8.1 Proteinisolierung (modifiziert nach Köhne, 1998)

Mit Hilfe dieser Methode kann das Gesamtprotein aus Pflanzengewebe isoliert werden.

- 150 mg Blattmaterial in ein Eppendorfgefäß einwiegen und in flüssigem Stickstoff gefrieren
- Pflanzenmaterial gefroren zermörsern
- Homogenat in 250 µl Proteinextraktionspuffer aufnehmen und gründlich vortexen, dann auf Eis lagern; Zentrifugation: 10 min, 13000 rpm, 4 °C; Proteinüberstand in neues Eppendorfgefäß überführen; Zentrifugation gegebenenfalls wiederholen

Der gewonnene Proteinextrakt wurde direkt zur Bestimmung des Proteingehaltes eingesetzt und anschließend bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei -80 °C aufbewahrt.

B2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentration kann nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt werden. Der in der Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 kann mit Proteinen Komplexe bilden. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm (ohne gebundene Proteine) auf 595 nm nach Bildung von Protein-Farbstoff-Komplexen.

- 200 µl Bradfordreagenz werden in die Slots einer 96-Microtiterplatte vorgelegt
- 50 µl Probe (1:100 verdünnt) direkt in die Slots mit dem Bradford-Reagenz geben und sorgfältig durch auf- und abziehen mit der Pipette mischen; 5 min bei RT inkubieren
- Bestimmung der Extinktion $_{595\text{nm}}$ am BIO-TEK SynergyTM HT Photometer für Microplatten
- anhand einer Eichkurve mit BSA kann die Proteinkonzentration ermittelt werden
- für jede Probe erfolgt eine Doppelbestimmung

B2.8.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach Lämmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht eine schnelle Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz SDS bindet bei Überschuß in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS/ 1 g Protein) an die hydrophoben Regionen der Proteine. Die daraus resultierende negative Ladungshülle bewirkt eine Überlagerung der Eigenladung der Proteine. Damit unterscheiden sich die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine nur noch in ihrer molekularen Größe. SDS-Protein-Komplexe sind elektrophoretisch sehr mobil und bewegen sich im elektrophoretischen Feld zur Anode. Die Molekularsiebeffekte der porösen Polyacrylamidmatrix bewirken eine Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht. Die Beweglichkeit eines Proteins ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus seines Molekulargewichtes. Das diskontinuierliche Puffersystem nach Lämmli (1970) ist die am häufigsten angewandte Methode, da die gleichzeitige Verwendung eines pH-, Puffer- und Acrylamidkonzentrationsprunges eine sehr scharfe Auftrennung der Proteine ermöglicht.

Herstellung und Lauf eines SDS-Polyacrylamidgels (15 %ig):

- Glasplatten, Spacer und Probenkämme mit H₂O und Ethanol reinigen
- Zusammenbau der Gelkassette und Abdichtung mit Agarose
- Vorbereitung des Trenngels:
 - 7,6 ml H₂O_{dd}
 - 7,6 ml Trenngel-Puffer (1,5 M Tris; pH 8,8)
 - 15,2 ml Acrylamid-Mix (30 %)
 - 25 µl 10 %iger (w/v) APS
 - 25 µl TEMED
- Trenngel bis ca. 4cm unter den oberen Rand der Gelkammer gießen
- mit Isopropanol überschichten und ca. 2 h auspolymerisieren lassen
- Isopropanol absaugen
- Vorbereitung des Sammelgels:
 - 5,775 ml H₂O_{dd}
 - 0,75 ml Sammelgel-Puffer (1 M Tris; pH 6,8)

2,55 ml Acrylamid-Mix (30 %)
38 µl 10 % (w/v) APS
38 µl TEMED

- Sammelgel aufgießen und Probenkamm einsetzen; auspolymerisieren lassen; Probenkamm ziehen
- Gelkassette in die Elektrophoresekammer einsetzen
- Kammer mit Lauf-Puffer (1x) füllen
- Probenauftrag: - 80 µg lyophilisiertes Protein mit 30 µl Ladepuffer mischen; 5 min bei 96 °C denaturieren; kurz an zentrifugieren; Proben auftragen
- Standard: 10 µl Prestained Protein MW Marker (Fermentas); 3 min auf 37 °C erhitzen; gründlich vortexen; kurz an zentrifugieren; auftragen
- Laufbedingungen: - im Sammelgel: 150 V, ca. 30 min
- im Trenngel: 200 V, bis gewünschte Auftrennung erreicht
- Das Gel konnte nachfolgend Coomassie-gefärbt oder direkt zum Immunoblotting eingesetzt werden.

B2.8.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

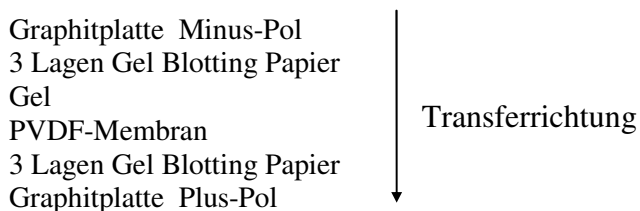
Die Coomassie-Färbung wurde genutzt, um eine gleichmäßige Beladung der Gele mit den Proteinproben zu kontrollieren. Da das PAT-Protein mit 20kD relativ klein ist und daher weit in Richtung der Anode läuft, konnten die oberen 2 cm des Trenngels für die Coomassie-Färbung eingesetzt werden. Diese Methode ermöglicht eine schnelle Färbung von Proteinen, die Empfindlichkeit ist jedoch mit 200 bis 400 ng / 0,5 cm Bande geringer als bei anderen Färbemethoden.

- Gel für 30 min in Fixierer inkubieren
- anschließend 30 min im Coomassie-Farbbad anfärben
- 30 min mit Entfärber waschen
- Entfärber-Lösung erneuern und üN bei RT entfärben

B2.8.5 Semi-Dry-Elektroblot für den Proteintransfer auf PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membranen (modifiziert nach Herstellerangaben)

Die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels der Trans-Blot SD-Anlage von BioRad auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P 0.45 µm, Millipore; nach Gültekin & Heermann, 1988) bzw. auf eine Nitrocellulosemembran (ECLTM Hybond, GE Healthcare) übertragen. Beim Verfahren des Elektro-Western-Blots werden die Proteine in einem elektrischen Feld, das zwischen zwei Graphitplatten anliegt, vom Gel auf eine Membran transferiert.

- Gel Blotting Papier in Transferpuffer tränken und luftblasenfrei auf die untere Graphitplatte legen
- PVDF-Membran, da hydrophob, zuerst in Methanol, anschließend ebenfalls in Transferpuffer tränken und auflegen; für Nitrocellulosemembran keine Aktivierung in Methanol
- Aufbau des Elektro-Western-Blots:



- Transferbedingungen Stromstärke: 2 mA/cm² Membran; Zeit: 2 h
- Die Membran konnte nun zur immunologischen Chemilumineszenz-Detektion eingesetzt werden.

B2.8.6 Chemilumineszenz-Detektion sowie NBT/BCIP-Detektion von immungefärbten Western Blots (modifiziert nach Herstellerangaben)

Gelblottete Proteine / Antigene lassen sich auf der Membran über eine indirekte immunologische Methode nachweisen. Der Blot wird zunächst mit einem unmarkierten Anti-Antigen-Antikörper inkubiert, der an ein spezifisches Antigen bindet. Nach Abwaschen ungebundener Primärantikörper wird der Blot mit einem markierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG, mit Peroxidase gekoppelt, Sigma; oder Anti-Rabbit IgG mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt, Sigma) inkubiert, der an den Primärantikörper bindet.

Nach weiterem Waschen wird der Blot mit Hilfe der Markierung des Sekundärantikörpers entwickelt. Der Peroxidase-markierte Antikörper (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol und löst dadurch eine Chemilumineszenz aus. Das emittierte Licht hat ein Maximum bei einer Wellenlänge von 428 nm und kann mittels eines Blaulicht-empfindlichen Autoradiographie-Films quantifiziert werden.

Der alkalische Phosphatase-markierte Antikörper (AP) katalysiert die Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT). Hierbei wird BCIP durch die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe in das entsprechende Indoxyl überführt, das zu einem Keton tautomerisiert. Unter den Detektionsbedingungen dimerisiert das Keton zu blauem Indigo, wobei H^+ freigesetzt wird. Dieses reduziert schließlich das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zum purpurnen Diformazan. Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus und färben die Umgebung der markierten DNA-Sonde dunkelviolett an.

Alle Blockierungs-, Hybridisierungs- und Waschschrte erfolgen bei RT in Schalen auf einem Schüttler (Shaker S4 von Elmi).

- falls PVDF-Membran nach dem Blotten getrocknet wurde, kurz in Methanol reaktivieren
- vor Reaktion des Blots mit den Antikörpern wird die Membran zunächst für 2h mit 1 x TBST + 5 % Milchpulver abgesättigt
- 2 h Hybridisierung mit Primärantikörper (Anti-PAT, 1:1000 in 1 x TBST + 5 % Milchpulver)
- 3 x 10min mit 1 x TBST waschen
- 1 h in 1 x TBST + 5 % Milchpulver blockieren
- 2 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG-HRP, 1:3000 bzw. Anti-Rabbit IgG-AP, 1:20000 in 1 x TBST + 5 % Milchpulver)
- 5 x 5 min mit 1 x TBS waschen
- Detektion mit Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NENTM Life Science):
 - 1 ml ECL-Reagenz I mit 1 ml Reagenz II mischen und gleichmäßig auf dem Blot verteilen und 1 min bei RT inkubieren; überschüssige Flüssigkeit entfernen
- Membran zwischen Frischhaltefolie legen und großzügig ausschneiden, in Filmkassette kleben
- Film (Kodak, BioMaxTM ML; Sigma) im Dunkeln auflegen
- 1 – 15 min Exposition bei RT, Exposition kann je nach Signalstärke wiederholt werden
- Western-Blots können nach Ende der Detektion getrocknet und bei RT monatelang aufbewahrt werden
- Bei Verwendung des sekundären Antikörpers gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase erfolgt die Detektion mit NBT / BCIP Entwicklung (1 - 60 min Exposition): 20 ml Detektionspuffer (P3) + 60 μ l NBT + 30 μ l BCIP

B2.8.7 Rehybridisierung von Western Blots

Da PVDF-Membranen mechanisch und chemisch sehr stabil sind, sind sie gut für eine mehrfache Hybridisierung geeignet. Vor Beginn einer neuen Hybridisierung ist jedoch ein Abwaschen der gebundenen Antikörper aus der vorangegangenen Hybridisierung nötig.

Da es sich bei den Membranen um hydrophobe PVDF-Membranen handelt, müssen diese zuvor in Methanol aktiviert werden. Anschließend kann die Rehybridisierung nur des Sekundär-Antikörpers oder beider Antikörper durchgeführt werden. Nach Abschluss der Rehybridisierung kann eine erneute Hybridisierung mit dem gleichen oder anderen Antikörpern begonnen werden.

B2.8.7.1 Rehybridisierung des Primär- und Sekundär-Antikörpers (nach Roche Molecular Biochemicals, 2000)

- 30 min bei 70 °C mit Stripping Puffer (siehe B1.5.8.6.) inkubieren
- 3 x 5 min mit 1 x TBST bei Raumtemperatur waschen

C Ergebnisse

C1 Einfluss *cis*-regulatorischer Sequenzen des Herbizidresistenzgens *pat* auf das mRNA- und Protein ‘steady state level’ unter optimalen Wachstumsbedingungen in Tabak

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen DNA-Regionen des *pat* Gens auf die Expression in SRI Tabakpflanzen bei 24 °C und unter Hitzestressbedingungen von 37 °C untersucht sowie mögliche Ursachen und Mechanismen aufgeklärt werden.

In SRI Tabak wurden alle in Abb.1 angegebenen *pat* Gene eingebracht, und bis einschließlich *pat46* in der T₀- und T₁-Generation untersucht. Zum besseren Verständnis werden die transgenen Tabakpflanzen nachfolgend nach ihrem enthaltenen *pat* Gen bezeichnet. Nachkommen einer Tabaktransformante (Event), die das *patOCA* Gen enthalten werden z. B. als *patOCA* Linie bezeichnet.

Die Expression der *pat* Gene stand jeweils unter Kontrolle des Promotors der Blumenkohlmosaikvirus 35S RNA (35S Promotor; Gardner et al., 1981). In den *pat41*-, *pat43*-, *pat44*-, *pat50*- und *pat51* Genen wurde ein 823 Basenpaare (bp) großes 35S Promotorfragment verwendet (Kriete et al., 1995), während im *patOCA*-, *pat45*-, *pat46*- und *pat49* Gen der 35S Promotor im 5' Bereich um 289 bp auf 534 bp verkürzt wurde (Eckes et al., 1989).

Alle *pat* Gene, die das kürzere 35S Promotorfragment enthalten, weisen als 5' untranslatierte Region (5' UTR) die 5' UTRS auf, die ursprünglich aus dem *patOCA* Gen (Eckes et al., 1989) stammt. Dagegen ist mit dem längeren 35S-Promotorfragment stets die 5' UTR41 aus dem *pat43* Gen (Köhne et al., 1998) kombiniert.

Ausschließlich das *pat40*- bzw. *pat41* Gen enthalten die originale Kodierregion aus *Streptomyces viridochromogenes*, alle weiteren *pat* Gene weisen den modifizierten *patS* Kodierbereich auf.

Die 3' untranslatierte Region (3' UTR) ist als der Bereich zwischen dem Translations-Stoppcodon und der Cleavage Site/Polyadenylierungsstelle des Transkriptionsterminators definiert. Direkt 3' des Stoppcodon wurden zusätzlich synthetische Sequenzen verschiedener Länge eingebracht, die zur übersichtlicheren Darstellung und entgegen der gemeinhin anerkannten Definition im Folgenden als 3' UTR bezeichnet werden. Der 3' UTR-Bereich reicht somit vom Translationsstopp bis zum Beginn des jeweiligen Terminatorfragments. Im *patOCA*- und *pat44* Gen ist die 19 bp lange 3' UTRS, *impat41*- und *pat45* Gen die 33 bzw. 53 bp lange 3' UTR41, und *impat43*- und *pat50* Gen die 12 bp lange 3' UTR43 enthalten.

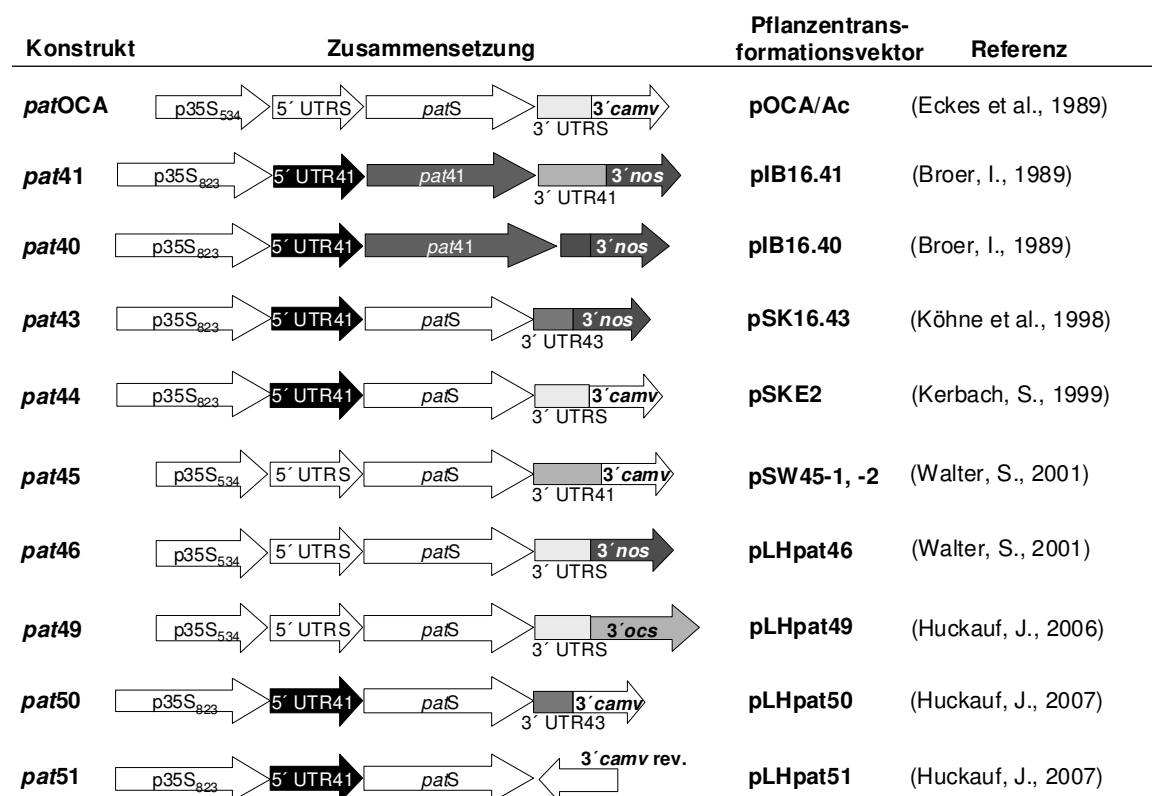


Abb. 1: Vergleichende Darstellung der untersuchten *pat* Konstrukte.

p35S	35S-rRNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus: 823 bp-Fragment (Gardner et al., 1981; Kriete, 1995); 534 bp-Fragment (Eckes et al., 1989)
5' UTR41	5' untranslatierte Region des <i>pat41</i> -Gens (Broer, 1989)
5' UTRS	5' untranslatierte Region des <i>patS</i> -Gens (Eckes et al., 1989)
<i>pat41</i>	modifizierter Kodierbereich des Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferasegens aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Broer, 1989)
<i>patS</i>	Kodierbereich des synthetisch hergestellten <i>pat</i> -Gens (Eckes et al., 1989)
3' UTR41	3' untranslatierte Region des <i>pat41</i> Gens (Broer, 1989)
3' UTRS	3' untranslatierte Region des <i>patOCA</i> Gens (Eckes et al., 1989)
3' UTR43	3' untranslatierte Region des <i>pat43</i> Gens (Köhne et al., 1998)
3' nos	Terminator des Nopalinsynthasegens aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Bevan et al., 1983)
3' ocs	Terminator des Octopinsynthasegens aus <i>A. tumefaciens</i> (De Greve et al., 1983)
3' camv	Terminator des 35S-rRNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus (Eckes et al., 1989)
3' camv rev.	Terminator des 35S-rRNA-Gens in <i>antisense</i> Orientierung

Vier verschiedene Transkriptionsterminatoren finden Verwendung in den verschiedenen *pat* Genen. Dabei handelt es sich um das Terminationssignal der 35S RNA des Blumenkohlmosaikvirus (3' *camv*; Pietrzak et al., 1986) im *patOCA*-, *pat44*-, *pat45*- und *pat50* Gen. Dieser wurde nicht nur in *sense* Orientierung verwendet, sondern findet im *pat51* Konstrukt ebenfalls in *antisense* Orientierung (3' *camv* reverse) Verwendung. Im *pat40*-, *pat41*-, *pat43*- und *pat46*-Gen wurde der Terminator des Nopalinsynthasegens genutzt, welches auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* lokalisiert ist (3' *nos*) (Bevan et al., 1983). Im *pat49* Gen wurde der Terminator des Octopinsynthasegens verwendet, der ursprünglich ebenfalls auf dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* lokalisiert ist (3' *ocs*; De Greve et al., 1982).

In dieser Arbeit wurden die *pat45* Linien in *pat45.1*- und *pat45.2* Linien unterschieden. Sie wurden mit verschiedenen Pflanzentransformationsvektoren (pSW45-1/pSW45-2) erzeugt und unterscheiden sich in der Orientierung des *pat* Gens auf der T-DNA. Sofern nicht näher bezeichnet, handelt es sich bei den *pat45* Linien um *pat45.2* Linien.

Um das Expressionslevel der transgenen SRI Tabaklinien vergleichen zu können, wurde das analysierte Pflanzenmaterial standardisiert, um physiologische Unterschiede zwischen den Individuen soweit wie möglich zu minimieren. Dazu wurden die Pflanzen nach der Transformation bzw. nach dem Aussäen der sterilisierten Samen unter standardisierten Licht- und Temperaturbedingungen kultiviert. Für die Hitzestressversuche wurden von jedem zu testenden Event jeweils zwei Klone in getrennten Pflanzencontainern bei 24 °C angezogen. Nach 2 bis 3 Wochen waren die Klone gut bewurzelt und hatten ausreichend Blattmaterial ausgebildet. Jeweils einer der beiden Klone wurde weiter bei 24 °C kultiviert, während der andere einem 10-tägigen Hitzestress bei 37 °C in einer Klimakammer mit vergleichbaren Lichtverhältnissen ausgesetzt wurde (Abb. 2). Anschließend wurden für die Analysen jeweils voll entwickelte, nicht seneszente Tabakblätter beprobt. Die Klone, die bei 24 °C kultiviert wurden, dienten nicht nur als Kontrollen für die Hitzestressversuche, sondern stellten auch das Untersuchungsmaterial für die Analysen zum *pat* Expressionslevel unter optimalen Wachstumsbedingungen.

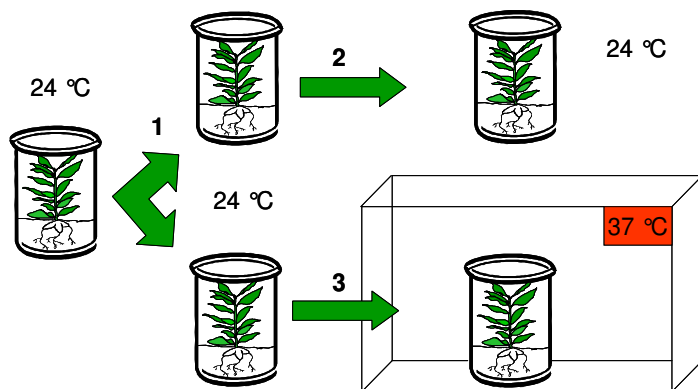


Abb. 2: Schema des Versuchsaufbaus

1) Anzucht der Pflanzen bei 24 °C und Generieren von Klonen. Kultivierung der Klone für ca. 2 bis 3 Wochen bei 24 °C, anschließend Kultivierung eines Klonen (2) für weitere 10 Tage bei 24 °C, des anderen Klonen (3) in Klimakammer bei 37 °C

C1.1 Die verschiedenen 5'- und 3'- Bereiche des *pat*Gens verursachen starke Unterschiede im Expressionslevel bei 24 °C

Köhne et al. (1998) berichteten von großen Unterschieden im *pat*mRNA- und Protein 'steady state level' zwischen Pflanzen, die das *pat41*- (Wohlleben et al., 1988) und jenen die das *patOCA*-Gen (Eckes et al., 1989) enthalten. Diese Unterschiede schienen auf die verschiedenen 5'- und 3' flankierenden Bereiche der *pat*Kodierregion zurückzuführen zu sein. In

dieser Arbeit wurden verschiedene Kombinationen dieser und weiterer 5'- und 3' Bereiche hinsichtlich ihres Einflusses auf das Expressionsniveau untersucht.

Zwölfbis 39 unabhängige Linien pro *pat*Gen wurden auf RNA-Ebene mittels Northern Blot Analyse und auf Proteinebene mithilfe der Western Blot Analyse untersucht. Zudem wurde die Aktivität der Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase, die durch das *pat*Gen kodiert wird, bestimmt. Dabei wird der vom Pat Protein katalysierte Umsatz von ^{14}C -D,L-Phosphinothricin (D,L-Pt) zu ^{14}C -L-N-Acetyl-Phosphinothricin (L-N-ac-Pt) über eine dünnschichtchromatographische Auftrennung detektiert. Die Umsatzrate von D,L-Pt zu L-N-ac-Pt ist das Maß für die transgenodierte Enzymaktivität. Bereits die Ergebnisse dieser drei nicht quantifizierenden Methoden zeigten teilweise reproduzierbar starke Expressionsunterschiede sowohl im RNA- als auch im Protein 'steady state level' zwischen den verschiedenen *pat*-Konstrukten (Abb. 3). Insbesondere für die Linien, die das *pat*OCA und *pat*50 Gen enthalten, konnte eine deutlich stärkere Expression im Vergleich zu den Linien der übrigen Konstrukte detektiert werden.

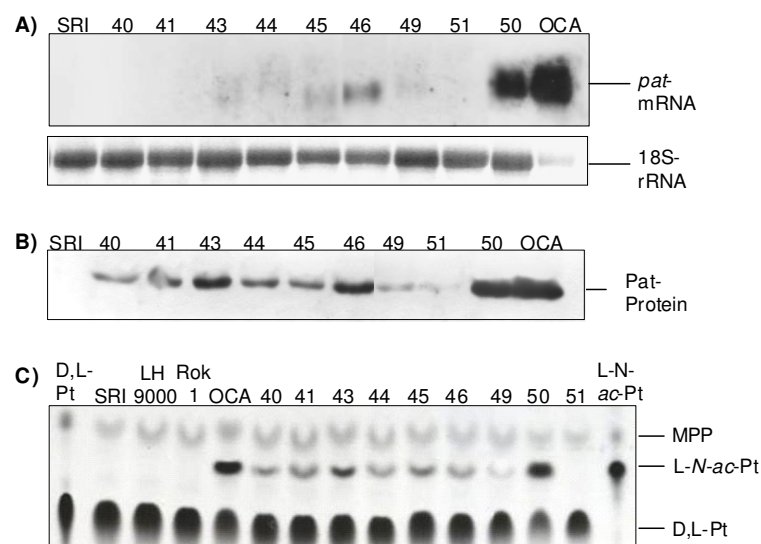


Abb. 3: Vergleich der *pat* Expressionsmuster der analysierten *pat* Gene in Tabak

A) Northern Blot von repräsentativen Vertretern jedes *pat* Gens. 5 (*pat*OCA)- bzw. 15 µg RNA-Extrakt wurden mittels Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall Corporation) übertragen und mit DIG-markierten *pat*S-/*pat*41-Sonden hybridisiert. SRI bezeichnet die nahe isogene Kontrolle (nik), 40 bis 51 und OCA die Repräsentanten der *pat*Gene *pat*40 bis *pat*51.

B) Western Blot von repräsentativen Vertretern jedes *pat* Gens. 30 (*pat*50, *pat*OCA)- bzw. 100 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE (15 % Polyacrylamid) aufgetrennt, auf eine ECL-Hybond-Membran (GE Healthcare) übertragen und mittels ECL-Chemilumineszenz visualisiert.

C) Analyse der Pat-Enzymaktivität in repräsentativen Vertretern jedes *pat* Gens. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Rok1 und LH9000 bezeichnen die leeren Transformationsvektoren; MPP, 3-Methylphosphinico-Propansäure

Eine Quantifizierung der *pat* mRNA erfolgte mittels quantitativer real-time Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR). Zur Bestimmung des relativen *pat* mRNA-Gehaltes wurden

die ermittelten SYBR Green Emissionswerte anhand derer des *actin1* Gens normalisiert, welches als endogenes Referenzgen diente. Die Berechnung erfolgte mit der $2^{-\Delta CT}$ -Methode (Schmittgen & Zakrajsek, 2000), bei der die C_T -Werte für *actin1* jeweils von denen für *pat* abgezogen und anschließend der Wert in die Gleichung $2^{-\Delta CT}$ eingesetzt wurden. Zur Berechnung der durchschnittlichen *pat* mRNA Konzentrationen pro Konstrukt wurden jeweils fünf zufällig ausgewählte, unabhängige Linien mittels qRT-PCR vermessen.

Die *pat*OCA Linien zeigten auf RNA-Ebene die mit Abstand höchste Expression (Abb. 4). Für die *pat*50- und *pat*46 Linien konnte ebenfalls ein leicht erhöhter *pat*mRNA-Gehalt im Vergleich zu den übrigen Konstrukten identifiziert werden, der jedoch um den Faktor 10 geringer war als der der *pat*OCA Linien.

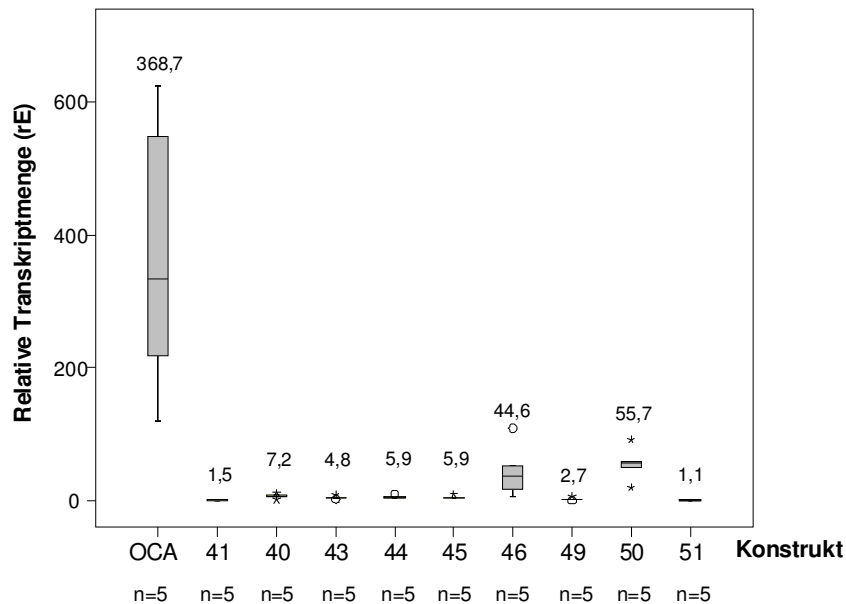


Abb. 4: Durchschnittliche *pat* mRNA ‘steady state level’ für alle *pat* Gene.

Boxplot der durchschnittlichen Transkriptmenge aus Messungen von 5 unabhängigen Linien pro *pat* Gen mittels qRT-PCR. Die Transkriptmenge ist angegeben in relativen Einheiten (rE). OCA und 40 bis 51 kennzeichnen die *pat* Gene *pat*40 bis *pat*51 und *pat*OCA.

Die Quantifizierung des Pat Proteins erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen Pat-ELISA (Steffens Biotechnische Analysen GmbH, Ebringen, Deutschland). Das Pat Protein liegt in der löslichen Proteinfraction vor, und wurde als Verhältnis Pat Protein pro gesamtlösliches Protein (TSP) bestimmt.

Dieselben fünf Linien pro Konstrukt, die in der qRT-PCR vermessen wurden sowie fünf weitere, zufällig ausgewählte Linien wurden mittels Pat-ELISA analysiert. Auf Proteinebene konnte eine deutlich stärkere Expression für die Linien, die das *pat*OCA und das *pat*50 Gen enthalten, detektiert werden (Abb. 5).

Die Ergebnisse dieser quantifizierenden Methoden bestätigen die Resultate aus Northern- und Western-Analysen sowie aus den Enzymaktivitätstests, die teilweise starke Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den einzelnen Konstrukten aufzeigten.

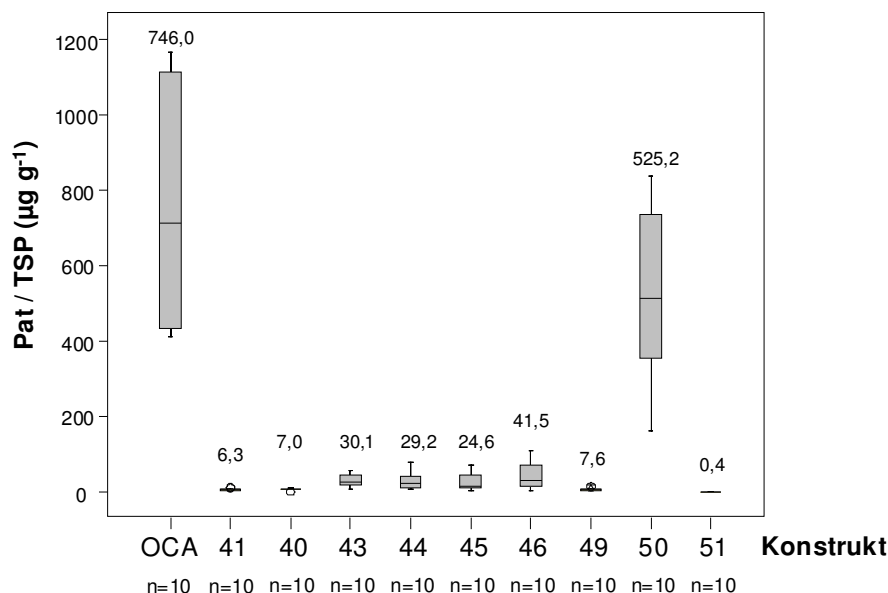


Abb. 5: Durchschnittliche Protein 'steady state level' für alle *pat* Gene.

Boxplot der durchschnittlichen Pat Proteinkonzentrationen im Verhältnis zum TSP in $\mu\text{g g}^{-1}$ aus Messungen von 10 unabhängigen Linien pro *pat* Gen mittels Pat-ELISA. OCA und 40 bis 51 kennzeichnen die *pat* Gene *pat40* bis *pat51* und *patOCA*.

In der T_1 -Generation traten zwischen Geschwistern einer Linie zum Teil starke Variationen im Expressionslevel auf (nicht dargestellt). Auch zwischen der T_0 - und T_1 -Generation derselben Linie konnten Expressionsunterschiede mit einem Variationskoeffizienten von mehr als 100 % beobachtet werden (Tabelle 4). Dieser errechnet sich als Quotient aus arithmetischen Mittelwert und Standardabweichung.

Tabelle 4: Pat Konzentrationen von 10 unabhängigen *pat46* Linien in der T_0 - und T_1 -Generation.

<i>pat46</i> Linie		9	23	36	43	61	62	67	68	71	73	MW
Pat Gehalt ($\mu\text{g g}^{-1}$ TSP)	T_0	9,20	40,67	8,15	5,24	82,03	12,24	12,92	96,91	108,55	11,79	38,8 + 13,0
	T_1	1,21	4,83	19,55	16,12	57,31	23,00	39,89	110,70	73,01	69,88	41,6 + 11,2
CV (%)		109	111	58	72	25	43	72	9	28	101	

Mittelwerte (MW) sind angegeben mit ihren Standardfehlern. CV, Variationskoeffizient; TSP, gesamtlösliches Protein.

Es wurde jedoch weder ein signifikanter Anstieg noch eine signifikante Reduktion des durchschnittlichen Protein 'steady state level' von 10 unabhängigen Linien in der T_0 - und T_1 -Generation (ein zufällig ausgewählter Nachkomme pro Linie) festgestellt. Zum Beispiel

beträgt der Pat Proteingehalt für 10 unabhängige *pat46*-Linien im Durchschnitt $38,8 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP in der T_0 -Generation im Vergleich zu $41,5 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP in der T_1 -Generation.

Daher wurden die *pat49*-, *pat50*- und *pat51* Linien ausschließlich in der T_0 -Generation analysiert. Die Ergebnisse zum *pat49* Konstrukt mit Ausnahme der Quantifizierung des *pat* mRNA Gehaltes stammen vornehmlich aus der Diplomarbeit von Henrik Nausch (2007), die ich während meiner Doktorarbeit betreute.

Im Folgenden werden die verschiedenen *pat* Genelemente und deren Einfluss auf das mRNA- und Protein ‘steady state level’ im Einzelnen betrachtet.

C1.2 Die Adaptation des Kodierbereichs an den Codongebrauch in Pflanzen führte zu einer signifikanten Steigerung des Pat Protein ‘steady state level’

Köhne et al. (1998) konnten keine Unterschiede im mRNA und Protein ‘steady state level’ zwischen Pflanzen, die das *pat43* Gen mit der modifizierten Kodierregion und denen die das *pat40*- bzw. *pat41* Gen mit der originalen Kodierregion aus *Streptomyces viridochromogenes* enthalten, feststellen. Die Quantifizierung der *pat* mRNA mittels qRT-PCR, und des Pat Proteins mithilfe des Pat-ELISA sollte diese Ergebnisse verifizieren. Die natürliche Kodierregion (*pat41*) ist bedingt durch die Klonierungsstrategie um eine Aminosäure (Leucin) verlängert worden (Broer, 1989). Sequenzvergleiche zeigten weiterhin, dass es neben den unterschiedlichen Kodierregionen auch Sequenzunterschiede in der 3' UTR zwischen den drei *pat* Genen gibt (Abb. 6B).

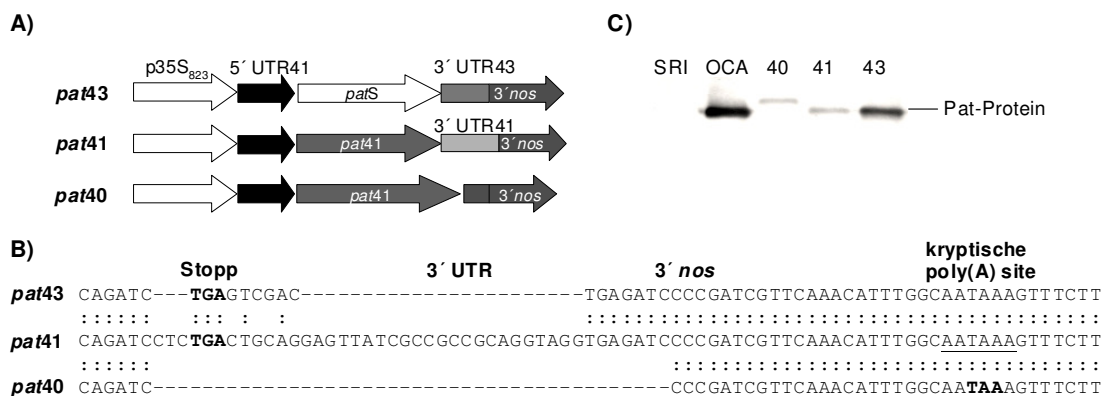


Abb. 6: Zusammensetzung des *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Gens (A), Sequenzvergleich ihrer 3' UTRs (B), sowie Western Blot von repräsentativen Vertretern (C).

A) Zusammensetzung des *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Gens. B) 3' UTR-Sequenzen des *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Gens. C) Western Blot Analyse von jeweils einer *patOCA*-, *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Transformante und der nahen isogenen Kontrolle (SRI). 30 (*patOCA*)- bzw. 100 μg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE (15 % Polyacrylamid) aufgetrennt, auf eine ECL-Hybond-Membran (GE Healthcare) übertragen und mittels ECL-Chemilumineszenz visualisiert.

So gibt es im Vergleich zum *pat41* Gen in den beiden anderen *pat*Genen verschiedene Deletionen in der 3' UTR. Im *pat43* Gen tritt eine Deletion von 23 Basenpaaren (bp), im *pat40* Gen sogar von 42 bp auf. Dabei wurde das Stoppcodon (TC) entfernt, und das nächste TC im Leseraster befindet sich erst innerhalb der unbenutzten (kryptischen) Polyadenylierungsstelle des *nos* Terminators (Bevan et al, 1983). Dadurch ist das Pat40 Protein um 7 Aminosäuren verlängert, was sich im Western Blot durch die abweichende Laufdistanz aufgrund der verschiedenen Proteingrößen identifizieren lässt (Abb. 6C).

Auf mRNA-Ebene lässt sich eine erhöhte spezifische Transkriptmenge für die *pat40* Linien im Vergleich zu den *pat41* Linien detektieren ($7,2 \pm 1,7$ vs. $1,5 \pm 0,5$ relative Einheiten, rE). Die unterschiedlichen 3' Bereiche des *pat40*- und *pat41* Gens resultieren demnach in einer unterschiedlichen Akkumulation der mRNA. Die Transkriptmengen zwischen den *pat40*-/*pat41* Linien und *pat43* Linien sind nicht direkt vergleichbar, da mittels der qRT-PCR unterschiedlich große Amplikons amplifiziert wurden (Abb. 7). So ist das Amplikon der synthetischen Kodierregion mit 528 bp, um das 1,87-fache größer als das der bakteriellen mit 282 bp, daher variieren die SYBR Green Emissionswerte. Der hohe GC-Gehalt des bakteriellen Kodierbereichs verhinderte es spezifische Primer abzuleiten, mit denen sich ein vergleichbar großes Fragment unter den gleichen PCR-Bedingungen amplifizieren lässt.

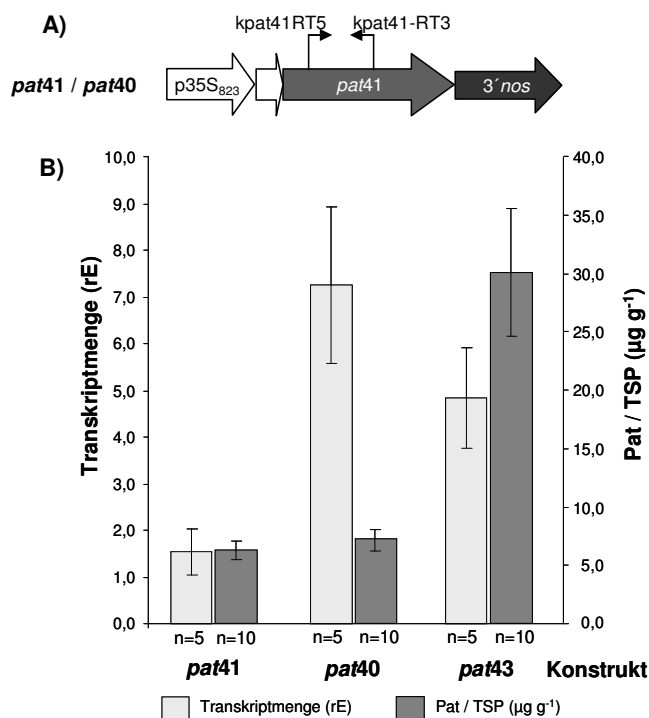


Abb. 7: Einfluss des Kodierbereichs auf die *pat* Expression.

A) Primerbindung bei der qRT-PCR für den bakteriellen und modifizierten Kodierbereich.

B) Ergebnisse aus qRT-PCR und Pat-ELISA. Mittelwerte errechnen sich aus Messungen von 5 unabhängigen Linien in der qRT-PCR und 10 unabhängigen Linien im Pat-ELISA. Mittelwerte sind angegeben in rE mRNA-Gehalt und µg g⁻¹ Pat/TSP.

Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Um die spezifischen RNA-Gehalte dennoch annäherungsweise vergleichen zu können, wurde der Faktor von 1,87 bei der Berechnung berücksichtigt. Die daraus resultierenden Ergebnisse

zeigen, dass der spezifische RNA-Gehalt der *pat43* Linien mit $4,8 \pm 0,9$ rE zwischen den RNA-Gehalten der *pat40*- und *pat41* Linien liegt.

Die durchschnittlichen Pat Proteingehalte der *pat41*- und *pat40* Linien sind trotz der Unterschiede auf RNA-Ebene vergleichbar ($6,3 \pm 0,8$ vs. $7,0 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP). Dagegen gibt es in den *pat43* Linien einen 4-fachen Anstieg ($30,1 \pm 5,5 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP) der durchschnittlichen Proteinkonzentration.

Die Anpassung des bakteriellen Kodierbereichs an die pflanzlichen Codonnutzung führte somit zu einem signifikanten Anstieg der Pat Protein 'steady state level'.

C1.3 Die 5' Region des *pat*Gens beeinflusst die Expression

Die beiden synthetischen 5' untranslatierten Regionen (5' UTRs), die sich jeweils unmittelbar zwischen den Transkriptions- und Translationsstartpunkten befinden, wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Expression untersucht. Die 5' UTRS stammt ursprünglich aus dem *patOCA* Gen und ist mit einem 534 bp langen CaMV35S Promotorfragment fusioniert, während die 5' UTR41 aus dem *pat43* Gen mit einem 823 bp langen CaMV35S Fragment kombiniert ist. Die beiden 5' UTRs weisen eine vergleichbare Länge auf, so besteht die 5' UTRS aus 31 bp und die 5' UTR41 aus 28 bp (Abb. 8B). Zusätzlich sind aufgrund der Klonierungsstrategie die 7 bp direkt stromaufwärts des AUG-Translationsstartcodons (AUG Kontext) in beiden UTRs identisch, und beinhalten eine *SalI* Restriktionsschnittstelle. Die verbleibenden Basenpaare der 5' UTRs sind jedoch heterolog, sodass möglicherweise die Expression davon beeinflusst wird.

Das *pat43* und *patOCA* Gen unterscheiden sich zusätzlich in ihren 3' Regionen, daher wurde zur Untersuchung des Einflusses der 5' Region das *pat44* Gen herangezogen. Das *pat44* Gen ist abgesehen vom 5' Bereich aus den gleichen Komponenten wie das *patOCA* Gen aufgebaut, sodass mögliche Expressionsunterschiede aus den verschiedenen 5' Regionen resultieren müssten. Die Bestimmung der mRNA-Gehalte ergab eine mehr als 60-fache Reduktion in *pat44* Linien ($5,9 \pm 1,2$ rE) im Vergleich zu den *patOCA* Linien ($368,7 \pm 95,9$ rE). Auf Proteinebene konnte in *pat44* Linien ein durchschnittlicher Proteingehalt von $29,2 \pm 7,9 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP, in den *patOCA* Linien von $746,0 \pm 97,6 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP gemessen werden (Abb. 8). Das entspricht einer mehr als 25-fachen Verringerung in den *pat44* Linien.

Der 5' Bereich des *patOCA* Gens verursachte eine signifikant stärkere Expression als der 5' Bereich des *pat44* Gens. Der Anstieg der Expression findet bereits auf mRNA-Ebene statt, da die *patOCA* mRNA zu einer 60-fach höheren Menge akkumuliert wird als die *pat44* mRNA.

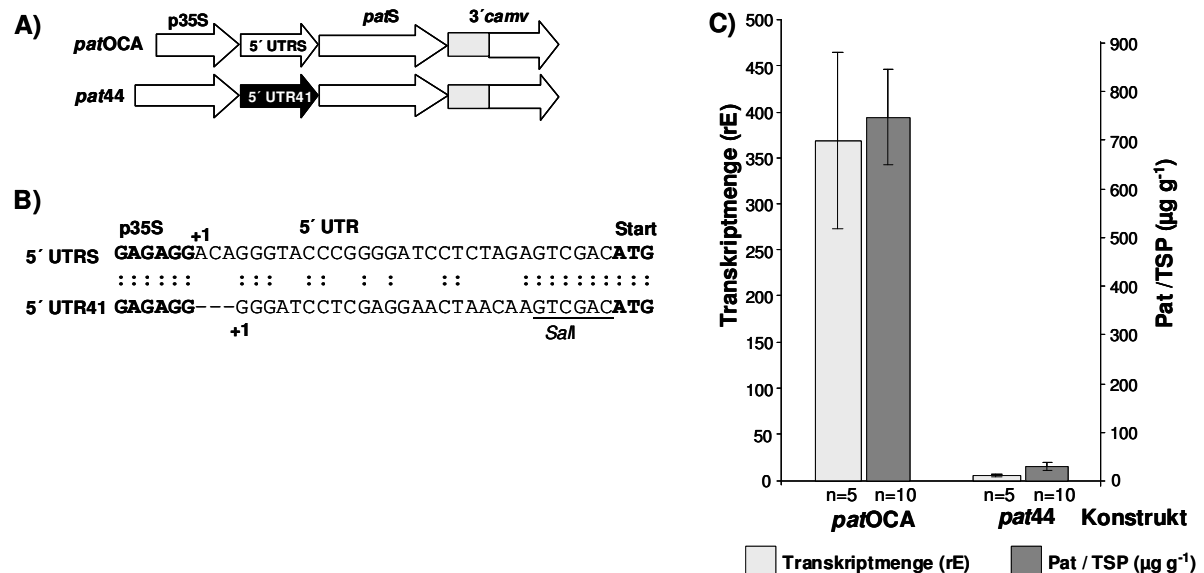


Abb. 8: Zusammensetzung des *patOCA*- und *pat44* Gens, Sequenz der 5' UTRS und 5' UTR41 und deren Einfluss auf die Expression.

A) Zusammensetzung des *patOCA*- und des *pat44* Gens. B) DNA-Sequenz der 5' UTRS im *patOCA*- und der 5' UTR41 im *pat44* Gen. C) Durchschnittliche mRNA- und Protein 'steady state level'. Mittelwerte errechnen sich aus Messungen von 5 unabhängigen Linien in der qRT-PCR und 10 unabhängigen Linien im Pat-ELISA, und sind angegeben in rE mRNA-Gehalt und µg g⁻¹ Pat/TSP. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

C1.4 Die 5' UTR41 scheint mit einer besseren Translationsrate verbunden zu sein als die 5' UTRS

Der Vergleich der durchschnittlichen relativen Transkriptmengen mit den durchschnittlichen Pat Proteinkonzentration ergab, dass die Verwendung der 5' UTR41 im *pat44* Gen zu wesentlich höheren Reduktionen auf RNA- als auf Proteinebene führte. Dies kann durch unterschiedliche Translationsraten verursacht sein. Um die Effizienz der Translation annäherungsweise beurteilen zu können, wurde für alle in Tabak untersuchten *pat* Gene der Quotient aus den durchschnittlichen Protein- und Transkriptmengen bestimmt (Tabelle 5). Dieser Quotient soll die Umsatzrate der *pat* mRNA in das Pat Protein wiedergeben. Der Vergleich der Quotienten für die einzelnen Konstrukte macht deutlich, dass mit Ausnahme der Konstrukte, die den bakteriellen Kodierbereich enthalten, *pat* Gene mit der 5' UTR41 mit einer höheren Umsatzrate verbunden sind als *pat* Gene mit der 5' UTRS. Der schwächste Umsatz errechnete sich für die *pat51* Linien, deren *pat51* Gen den 3' *camv* in *antisense* Orientierung enthalten. Auch andere *pat* Genelemente scheinen einen Einfluss auf die Umsatzrate zu haben. So führte der 3' *camv* beispielsweise zu einem höheren Umsatz als der 3' *nos*, während mRNAs, die die 3' UTR43 enthalten, nach den ermittelten Daten besser umgesetzt werden als solche, die die 3' UTRS oder 3' UTR41 aufweisen.

Tabelle 5: Umsatzrate der *pat* mRNA in das Pat Protein.

<i>pat</i> Gen	MW Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MW Transkript- menge (rE)	Quotient Pat / Transkriptmenge	Zusammensetzung des <i>pat</i> Gens
<i>pat50</i>	525,23	55,65	9,437	
<i>pat43</i>	30,08	4,83	6,224	
<i>pat44</i>	29,20	5,86	4,982	
<i>pat45</i>	24,59	5,90	4,170	
<i>pat41</i>	6,29	1,54	4,087	
<i>pat49</i>	7,65	2,73	2,803	
<i>patOCA</i>	746,00	368,67	2,024	
<i>pat40</i>	7,01	7,25	0,968	
<i>pat46</i>	41,55	44,64	0,931	
<i>pat51</i>	0,43	1,09	0,394	

Im Gegensatz zur 5' UTRS, der mit einer höheren Transkriptionsrate verbunden ist, wirkt sich die 5' UTR41 im Allgemeinen vorteilhafter auf die Translationsrate aus.

C1.5 Deletionen in der 3' UTR führen zu Unterschieden im mRNA- und Protein- 'steady state level'

Eine Reihe von *pat*-Konstrukten wurde erstellt, mit deren Hilfe der Einfluss von einem zusätzlich in den 5' Bereich der 3' UTR eingebrachten Fragment untersucht werden soll. Die 3' UTR ist im Allgemeinen als der Bereich zwischen dem Translationsstoppcodon (TC) und der Cleavage Site/Polyadenylierungsstelle des Transkriptionsterminators definiert. Zur übersichtlicheren Darstellung werde ich jedoch entgegen dieser gemeinhin anerkannten Definition im Folgenden ausschließlich den zusätzlich eingebrachten 5' Bereich der 3' UTR, der vom TC bis zum Beginn des jeweiligen Terminatorfragments reicht, als 3' UTR bezeichnen. Als Folge der Klonierungen handelt es bei den 3' UTR Sequenzen z. T. um Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen (Abb. 9). So befinden sich direkt stromabwärts des TC eine *SalI* und eine *PstI*-Schnittstelle. In der 3' UTRS des *patOCA* und *pat44* Gens folgt darauf eine *SphI*-Schnittstelle. In der 3' UTR41 des *pat45* Gens sind zwischen den *PstI* und *SphI* Erkennungssequenzen weitere 33 bp lokalisiert. In der 3' UTR43 des *pat50* Gen kommt es zu weiteren Deletionen der *PstI* und *SphI*-Schnittstellen, wohingegen 5 bp (TGAGA) vorhanden sind, die in der 3' UTRS nicht vorkommen. Alle vier *pat*-Gene nutzen die Polyadenylierungssignale des CaMV35S Terminators (3' *camv*).

	1	10	20	30	40	50	60	70
	<i>SalI</i>	<i>PstI</i>				<i>SphI</i>		
<i>patOCA</i>	TGAGTCGACCTGCAG-----					GCATGCCCGCTGAAATCACCAGTCT		
	::::::::::::::::::::					::::::::::::::::::::::::::::::::::::		
<i>pat45</i>	TGAGTCGACCTGCAGCTCAATAGGCCGCCGCGAGTTTCCAGTGAGATCCGCGATGCCCGCTGAAATCACCAGTCT					GCATGCCCGCTGAAATCACCAGTCT		
	::::::::::::::::::::					::::::::::::::::::::::::::::::::::::		
<i>pat44</i>	TGAGTCGACCTGCAG-----					GCATGCCCGCTGAAATCACCAGTCT		
	::::::::::::					::::::::::::::::::::::::::::::::::::		
<i>pat50</i>	TGAGTCGAC-----					TGAGA-----CCGCTGAAATCACCAGTCT		

Abb. 9: Überblick über die verschiedenen 5' Bereiche des 3' UTR.

Übersicht der 5' Bereiche der verschiedenen 3' UTRs in den *pat* Genen *patOCA*, *pat45*, *pat44* und *pat50*. Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *SalI*, *PstI* und *SphI* sind unterstrichen.

Das *patOCA*- und das *pat45*Gen sind mit Ausnahme der abweichenden 3' UTRs identisch, sodass mögliche Expressionsunterschiede mit diesem Bereich assoziiert werden können. Die 3' UTRs des *patOCA* Gens verursacht einen mehr als 60-fachen höheren *pat* mRNA-Gehalt. Mithilfe des Pat-ELISA konnte 30-mal mehr Pat Protein in den *patOCA* Linien als in den *pat45* Linien gemessen werden. So enthalten die *patOCA* Linien eine durchschnittliche Pat Konzentration von $746,0 \pm 95,9$, wohingegen die *pat45* Linien einen Pat Proteingehalt von $24,6 \pm 7,5 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP aufweisen (Abb. 10).

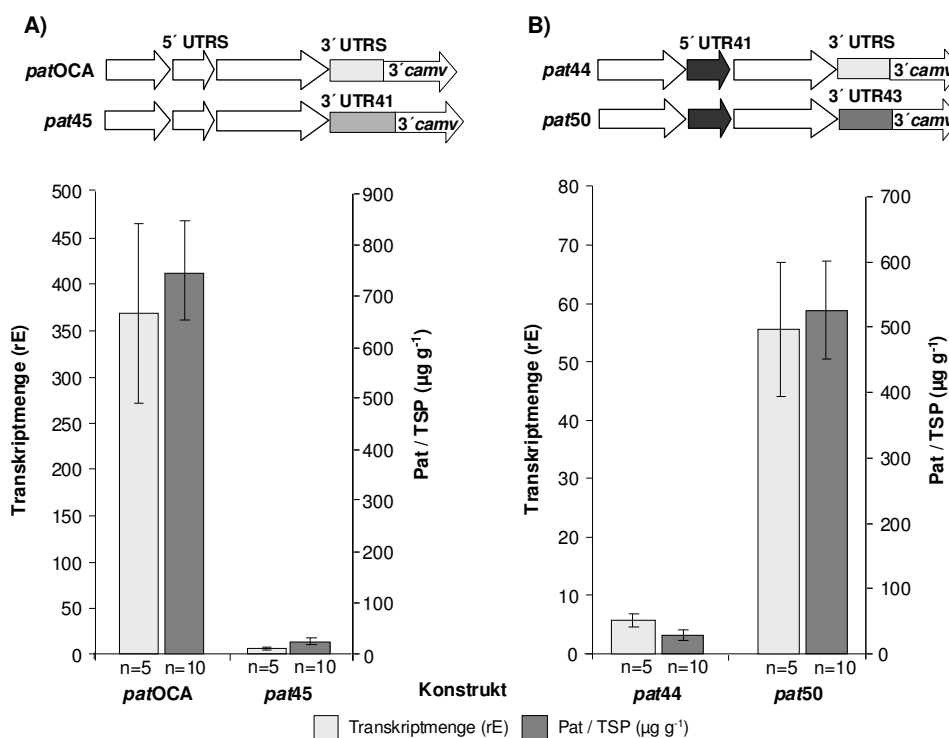


Abb. 10: Einfluss der verschiedenen 5' Bereiche der 3' UTRs auf das Expressionslevel.

Durchschnittliche mRNA- und Protein 'steady state level' für A) *patOCA*- und *pat45* Linien sowie B) *pat44*- und *pat50* Linien. Mittelwerte errechnen sich aus Messungen von 5 unabhängigen Linien in der qRT-PCR und 10 unabhängigen Linien im Pat-ELISA, und sind angegeben in rE mRNA-Gehalt und $\mu\text{g g}^{-1}$ Pat/TSP. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

Zwei weitere *pat* Gene, die sich in ihrer 3' UTR unterscheiden und daher eine Charakterisierung von dessen Einfluss auf das Expressionslevel ermöglichen, sind das *pat44* und das *pat50* Gen. Da beide Gene die 5' UTR41 enthalten, ist ein direkter Vergleich mit dem *patOCA* und *pat45* Gen nicht möglich, die ihrerseits die 5' UTRS beinhalten. Das *pat44* Gen enthält die 3' UTRS des *patOCA* Gens, das *pat50* Gen die 3' UTR43 (Abb. 9).

Die Ergebnisse aus qRT-PCR zeigten einen 9-fach höheren Gehalt an *pat* mRNA in den *pat50* Linien (Abb. 10). Im Pat-ELISA konnte sogar 18-mal mehr Pat Protein in den *pat50* als in den *pat44* Linien detektiert werden ($525,2 \pm 75,4$ vs. $29,2 \pm 7,9 \mu\text{g g}^{-1}$ TSP). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen konnte bezüglich der 3' UTR43 der größte Effekt nicht auf RNA-Ebene sondern auf Proteinebene ermittelt werden. Es scheint daher, dass die 3' UTR43 nicht nur eine Akkumulation höherer mRNA-Mengen ermöglicht, sondern auch zu einer erhöhten Effizienz der Translation im Vergleich zur 3' UTRS des *pat44* Gens führt. So konnte für das *pat50* Gen die höchste Umsatzrate von RNA in Protein detektiert werden. Die zweitbeste Umsatzrate konnte für die *pat43* RNA bestimmt werden, die ebenfalls mit der verkürzten 3' UTR43 ausgestattet ist (Tabelle 5).

Es hat den Anschein, dass Verlängerungen im 5' Bereich der 3' UTR einen negativen Einfluss auf das Expressionslevel haben, denn je kürzer dieser Bereich ausfällt, desto höher ist die Expression.

C1.6 Die verschiedenen Transkriptionsterminatoren verursachensignifikante Unterschiede im *pat* Expressionslevel

Vier verschiedene Transkriptionsterminatoren/Polyadenylierungssignale wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' charakterisiert. Dabei handelt es sich u. a. um das Polyadenylierungssignal der 35S RNA des Blumenkohlmosaikvirus (3'*camv*) (Pietrzak et al., 1986). Dieser wurde nicht nur in *sense* Orientierung verwendet, sondern findet im *pat51* Konstrukt ebenfalls in *antisense* Orientierung (3'*camv* reverse) Verwendung. Als drittes wurde der Terminator des Nopalinsynthasegens genutzt, welches auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* lokalisiert ist (3'*nos*) (Bevan et al., 1983). Auch der vierte verwendete Terminator stammt vom Ti-Plasmid von *A. tumefaciens*, und ist ursprünglich für die Transkriptionstermination des Octopinsynthasegens verantwortlich (3'*ocs*; De Greve et al., 1982). *Camv*-, *nos*- und *ocs*-Terminatoren finden häufig Anwendung in der Pflanzenbiotechnologie, und gehören zu den am besten charakterisierten Polyadenylierungssignalen (Hunt, 1994; Rothnie, 1996).

Äquivalent zum *patOCA* Gen, das den 3' *camv* enthält, wurden zwei Konstrukte erstellt, die mit Ausnahme der Terminatoren identisch sind (Abb. 11). Das *pat46* Gen enthält den 3' *nos*, während das *pat49* Gen den 3' *ocs* aufweist.

	Stopp	3' UTRS	3' <i>camv</i>
<i>patOCA</i>	TGA	TCGACCTGCAGGCATGCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATG	
		3' <i>nos</i>
<i>pat46</i>	TGA	TCGACCTGCAGGCATGCTCCCCGATCGTTCAAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG	
		3' <i>ocs</i>
<i>pat49</i>	TGA	TCGACCTGCAGGCATGCCTGCTTTAATGAGATATGCGAGACGCCTATGATCGCATGATATTTGCTTTC	
		3' UTR43
<i>pat50</i>	TGA	TCGACTGAGA-----CGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATG	
		3' <i>nos</i>
<i>pat43</i>	TGA	TCGACTGAGA-----TCCCCGATCGTTCAAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG	
		3' <i>camv</i> reverse
<i>pat51</i>	TGA	TCGAC-----CCACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAATTTTATTGATAGAAGTATTTT	

Abb. 11: Überblick über die verschiedenen 5' Bereiche des 3' UTRs für *pat* Gene, die sich in ihren Transkriptionsterminatoren unterscheiden.

Für beide Gene konnte im Vergleich zum *patOCA* Gen eine starke Reduktion der *pat* Expression bereits auf RNA-Ebene beobachtet werden (Abb. 12A). Die *pat46* mRNA wurde um das 8-fache ($44,6 \pm 18,1$ rE), die *pat49* mRNA sogar um mehr als das 130-fache reduziert ($2,7 \pm 1,1$ rE). Ähnlich zu den Reduktionen auf mRNA-Ebene wurden auch die durchschnittlichen Pat Proteingehalte um das 18-fache ($41,6 \pm 11,2$ $\mu\text{g g}^{-1}$ TSP) in den *pat46* Linien und um das 100-fache ($7,7 \pm 1,3$ $\mu\text{g g}^{-1}$ TSP) in den *pat49* Linien reduziert. Das Verhältnis von *pat46* mRNA und Protein lässt vermuten, dass es neben der Reduktion auf mRNA-Ebene zu einer weiteren Reduktion auf Proteinebene kommt (Tabelle 5).

Drei weitere *pat* Gene, die sich in ihren Polyadenylierungssignalen unterscheiden, stellen das *pat43*, *pat50* und *pat51* Gen dar. Diese drei Gene enthalten die 5' UTR41. Das *pat50* Gen enthält die 3' UTR43 und den 3' *camv*, während das *pat43* Gen mit der 3' UTR43 und dem 3' *nos* ausgestattet ist.

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen, führte in den *pat43* Linien die Verwendung des 3' *nos* zu einer durchschnittlichen Reduktion auf mRNA Ebene um das 12-fache ($4,8 \pm 1,1$ rE) im Vergleich zum 3' *camv* in den *pat50* Linien ($55,7 \pm 11,4$ rE; Abb. 12B). Auf Proteinebene ließen sich ebenfalls vergleichbare Reduktionen detektieren. So konnten für die *pat43* Linien mit einem durchschnittlichen Proteingehalt von $30,1 \pm 5,5$ rE 17-mal weniger Pat Protein gemessen werden als in den *pat50* Linien mit $525,2 \pm 75,4$ $\mu\text{g g}^{-1}$ TSP. Somit führte der 3' *nos* unabhängig von 5'- und 3' UTR zu vergleichbaren Reduktionen der *pat* Expression im Vergleich zum 3' *camv*.

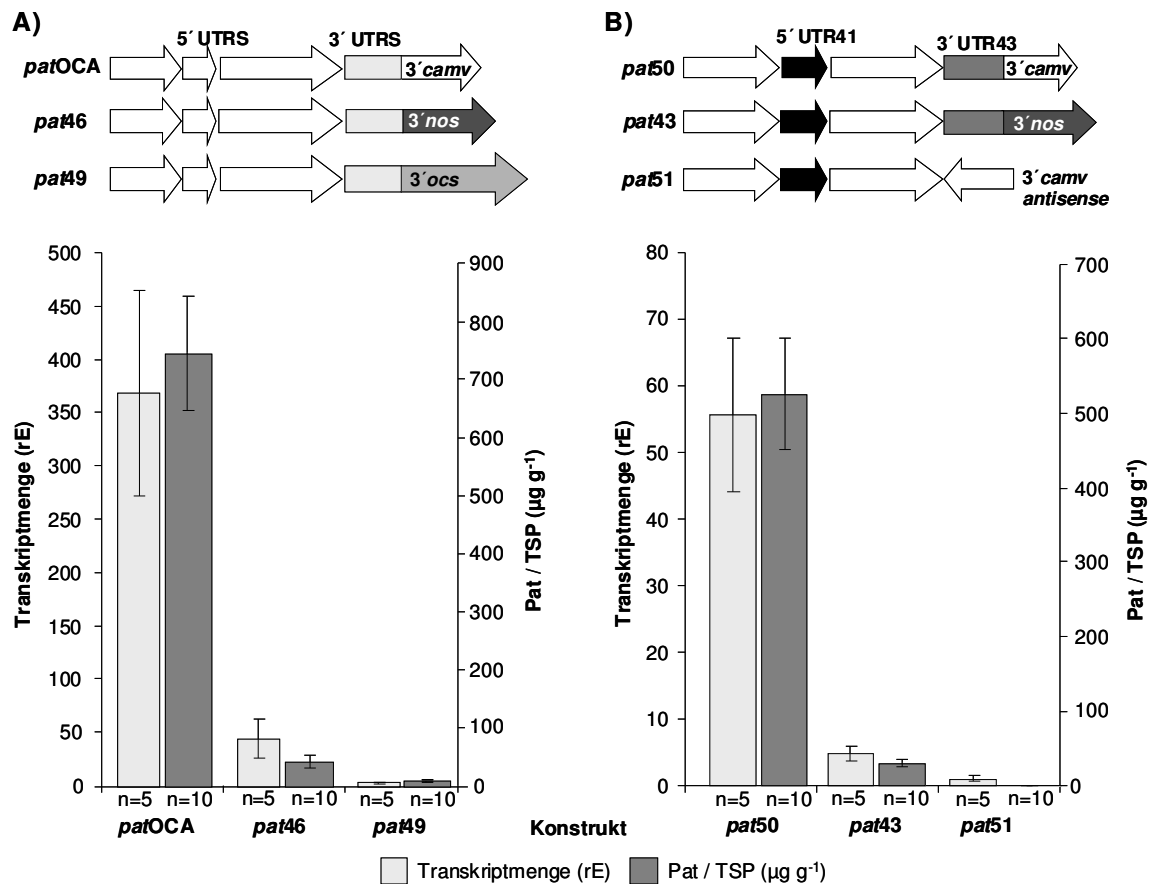


Abb. 12: Einfluss der verschiedenen Transkriptionsterminatoren auf die Expression.

Durchschnittliche mRNA- und Protein 'steady state level' für A) *patOCA*-, *pat46*- und *pat49* Linien sowie B) *pat50*-, *pat43*- und *pat51* Linien. Mittelwerte errechnen sich aus Messungen von 5 unabhängigen Linien in der qRT-PCR und 10 unabhängigen Linien im Pat-ELISA, und sind angegeben in rE mRNA-Gehalt und µg g⁻¹ Pat/TSP. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

Das *pat51* Gen weist in der 3' UTR Region mit Ausnahme der *SalI*-Klonierungsschnittstelle, die auf das TC folgt, keine Sequenzübereinstimmungen mit den 3' UTRs der anderen *pat* Gene auf. Die *antisense* Orientierung des 3'*camv* führte zu einem starken Abfall der *pat* Expression. So ist der durchschnittliche spezifische RNA-Gehalt in den *pat51* Linien mit $1,1 \pm 0,5$ rE um das 50-fache geringer als in *pat50* Linien, deren *pat* Gen den 3'*camv* in *sense* Orientierung beinhaltet. Die durchschnittliche Pat Konzentration ist sogar um mehr als das 600-fache reduziert, und erreicht mit $0,43 \pm 0,05$ µg g⁻¹ TSP nur knapp die Detektionsgrenze des Pat-ELISA. Im Western Blot war es nicht möglich Pat Protein der *pat51* Linien zu detektieren, und die Enzymaktivität ließ sich nur unter Verlängerung der Expositionszeit auf 14 Tage auf den Autoradiographie-sensitiven Kodak® BioMax™ MR-Film (Sigma-Aldrich) nachweisen.

Der 3'*camv* ist mit einer signifikant höheren Expressionsrate verbunden als der 3'*nos* und der 3'*ocs*. Das 3'*camv* Fragment in *antisense* Orientierung führt zur schwächsten Expression aller untersuchten *pat* Gene.

C1.7 Die Transkriptionsterminatoren sind mit einer unterschiedlichen Anzahl von 3' Transkriptenden assoziiert

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die drei Terminatoren 3'*camv*, 3'*nos* und 3'*ocs* hinsichtlich der Anzahl der verwendeten 'Cleavage Sites' (CS) und damit der Diversität ihrer 3'-mRNA-Enden unterscheiden. Dabei wird ein negativer Einfluss von multiplen CS auf das Expressionsniveau diskutiert (Yang et al., 2009), indem heterogene Transkripte mit unterschiedlichen 3'-Enden möglicherweise die mRNA Stabilität, Translatierbarkeit und Fähigkeit zur Proteinbildung beeinträchtigen. Dieser Mechanismus, der auch als alternative Polyadenylierung bezeichnet wird, ist in Pflanzen weit verbreitet.

Alle vier verwendeten Polyadenylierungssignale wurden hinsichtlich ihrer CS charakterisiert. Dazu wurden verschiedene *patc*DNA-Proben mittels RT-PCR unter Benutzung eines forward Primers amplifiziert, der direkt 5' des TC (siehe Abb. 13b) im *patS*-Kodierbereich bindet. Als reverse Primer wurde ein Gemisch aus drei OligodT-Primern mit der Sequenz 5'-CGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA/C/G-3' eingesetzt, bei denen jeweils die letzte Base am 3' Terminus gewährleisten soll, dass der Primer am 5' Terminus des Poly(A)-Schwanzes bindet (Pappu et al., 1993). Die Größe der erwarteten PCR-Fragmente lag in einem Bereich von 200 bis 350 bp, sodass eine Auftrennung der PCR-Produkte in einem 4 % (w/v) Agarosegel eine gute Abschätzung der Fragmentgrößen, und damit der verwendeten CS ermöglichte.

Für alle *pat* Gene, die den 3'*camv* als Polyadenylierungssignal enthalten (*patOCA*, *pat50*, *pat44*, *pat45*), konnte jeweils nur ein Fragment identifiziert werden. In Abhängigkeit von den unterschiedlich langen 3' UTRs innerhalb der Konstrukte (Abb. 9) schwankten die PCR-Fragmentgrößen zwischen 240 bp (*pat50*) und 280 bp (*pat45*), die somit den erwarteten Fragmentgrößen unter Benutzung der Major CS entsprechen (Sanfaçon et al., 1990; Abb. 13). Das 3'*camv* Fragment in *antisense* Orientierung wurde erstmals in dieser Arbeit auf dessen verwendete CS untersucht. Im Gegensatz zum 3'*camv* Fragment in *sense* Orientierung wurden in den verschiedenen *pat51* Proben eine Reihe von unterschiedlich großen Fragmenten sichtbar. Dies macht deutlich, dass die Polyadenylierung hier an verschiedenen Stellen stattfindet. Die einzige PCR-Bande, die in allen untersuchten *pat51* Proben vorkommt, weist eine Größe von ca. 265 bp auf. Dies entspricht einer CS, die unmittelbar am 3'-Ende des Terminatorfragments lokalisiert ist (schwarzer Pfeil; Abb. 13b). Sie wird jedoch nicht in allen Linien in vergleichbarem Maße verwendet. Darüber hinaus entstanden in den *pat51* Linien *pat* Transkripte, deren Polyadenylierungsstellen innerhalb dieses Fragmentes liegen (rote Pfeile). Die Mehrzahl der Transkripte verwendete jedoch v. a. CS, die 3' des *camv* reverse Fragmentes lokalisiert sind. Viele der CS werden in mehreren verschiedenen, jedoch

nicht allen Pflanzen verwendet. Insgesamt konnte für jede untersuchte *pat51* Pflanze mindestens 5 verschiedene *pat* Transkripte, die sich in ihren 3'-Enden unterscheiden, identifiziert werden. Es könnten weitere 3' Transkriptenden vorhanden sein, deren Abundanz jedoch zu gering ist um deutlich sichtbare PCR-Fragmente hervorzurufen.

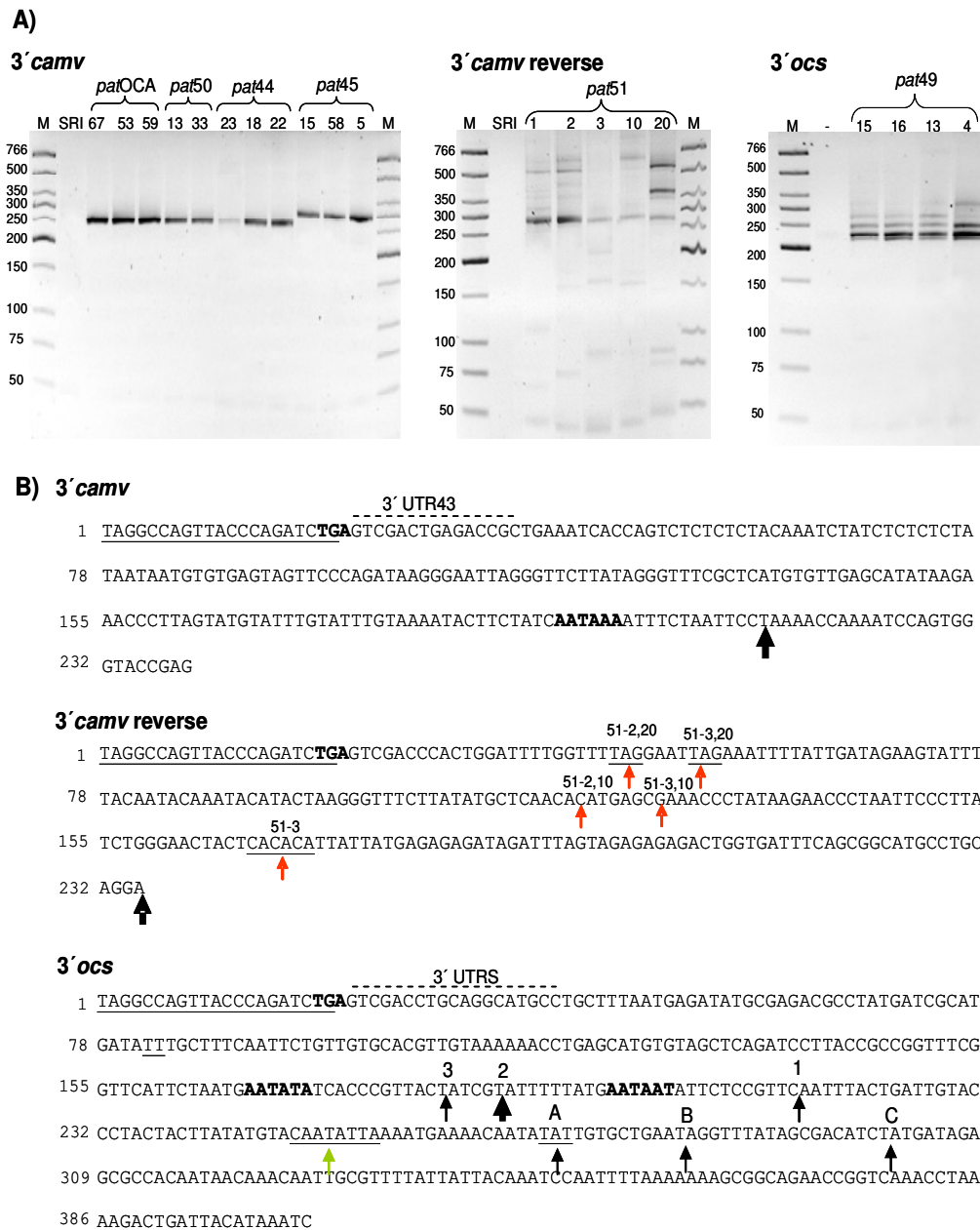


Abb. 13: Charakterisierung der *pat* 3' Transkriptenden in verschiedenen *pat* Pflanzen, die den 3' *camv* bzw. den 3' *camv* reverse enthalten.

A) Auftrennung von RT-PCR-Fragmenten verschiedener *pat* Pflanzen amplifiziert mithilfe des *pat*S-3'fw- und OligodT-rv Primers in 4 % (w/v) Agarosegel. B) Sequenz des 3' *camv*, 3' *camv*antisense und 3' *ocs* Fragments. TC und AATAAA-ähnliche Sequenzen sind fett dargestellt. Major CS mit fetten, schwarzen Pfeil angezeigt, Minor CS mit roten Pfeilen. Zusätzliche CS im 3' *ocs* mit grünem Pfeil markiert. Unterstrichene Sequenz am 5'-Ende der Fragmente kennzeichnen die Bindestellen des forward Primers Unterbrochene Linie über Sequenz am 5' Ende des 3' *camv* kennzeichnet die 3' UTR43 des *pat*50 Fragments, am 5' Ende des 3' *ocs* die 3' UTRS des *pat*49 Fragments. M, Low Molecular DNA Ladder (NEB).

Für die beiden Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens* wurden bereits von der Verwendung multipler CS berichtet (Bevan et al., 1983; Yang et al., 2009). Für den 3'ocs wurden 6 unterschiedliche CS beschrieben (MacDonald et al., 1991), jeweils 3 (1-3 und A-C) sind mit einer der beiden AATAAA-ähnlichen Regionen assoziiert. In den untersuchten *pat49* Pflanzen lassen sich PCR-Produkte identifizieren, die den erwarteten Fragmentgrößen unter Benutzung dieser CS entsprechen. Den Hauptanteil stellten dabei die CS 1-3. Als Major CS diente hier jedoch die CS 2 mit einer Fragmentgröße von 219 bp, im Gegensatz zur CS 1 mit einer Größe von 245 bp, die von MacDonald et al. (1991) als Major CS beschrieben wurde. Anhand der Bandenstärke der PCR-Fragmente wird deutlich, dass ein hoher Anteil der Transkripte nicht an der Major CS polyadenyliert werden. So benutzen viele Transkripte die CS 1, 3 bzw. eine bislang unbeschriebene CS mit einer Fragmentgröße von ca. 270 bp (grüner Pfeil), die zwischen den CS 1 und A lokalisiert ist. Die CS A-C, die Fragmentgrößen von 302 bp, 313 bp und 331 bp erzeugen, werden zu einem deutlich geringeren Anteil verwendet. So ist ein ca. 313 bp großes PCR-Fragment nur in Pflanze *pat49-4* deutlich zu identifizieren. Für alle untersuchten *pat46* Pflanzen konnten 4 verschiedene PCR-Fragmente identifiziert werden (Abb. 14). Die beiden größeren Fragmente entsprechen der beschriebenen Major CS (Bevan et al., 1983) mit einer Fragmentgröße von 235 bp, sowie der oder den Minor CS bei 222 bp und 225 bp, die zu dicht beieinander liegen, um sie im Agarosegel als getrennte Fragmente auftrennen zu können. Die beiden kleineren Fragmente bei ca. 125 bp und 110 bp entsprechen CS, die bereits von Yang et al. (2009) für die Expression des Hausstaubmilbenantigens *mDer f 2* identifiziert wurden. Dieselben vier CS wurden auch von allen untersuchten *pat43* Pflanzen verwendet, die PCR Fragmente sind aufgrund des kürzeren 3' UTR₄₃ etwas kleiner. In fast allen untersuchten *pat43* Pflanzen sowie in der Pflanze *pat46-71* konnte ein zusätzliches Fragment mit einer Größe von ca. 280 bp identifiziert werden. Dies entspricht einer CS (roter Pfeil), die bisher nicht beschrieben wurde. Die meisten *pat43* Pflanzen weisen zudem CS auf, die stromabwärts des eigentlichen Terminatorfragments liegen. Demzufolge gibt es zwischen *pat46* und *pat43* Unterschiede in der Polyadenylierung. Noch größere Unterschiede traten in den *pat40*- und *pat41* Linien auf, die beide ebenfalls den 3'nos enthalten. Die Fragmente sind bei *pat40* um ca. 150 bp und bei *pat41* um ca. 190 bp größer, da hier ein weiter stromaufwärts bindender forward Primer (41-20) eingesetzt wurde. Die Präferenz für die Major CS, wie sie für *pat43*- und *pat46* Linien auftrat, war für die *pat40*- und *pat41* Linien nicht gegeben. Für alle untersuchten *pat40*- und *pat41* Linien konnte zwar die Verwendung der Major CS nachgewiesen werden, jedoch zu einem deutlich geringeren Anteil. In den *pat40* Linien wurde in ähnlicher Frequenz wie an der Major CS an einer CS polyadenyliert, die stromaufwärts der kryptischen *nos* Stelle lokalisiert ist. Auch für

die *pat41* Linien kann man die Verwendung einer CS detektieren, die stromaufwärts der kryptischen *nos* Stelle liegt. Dies war weder in den *pat46*- noch in den *pat43* Linien der Fall. In diesem Bereich unterscheidet sich die Sequenz in den vier *pat* Genen, die den 3'*nos* enthalten.

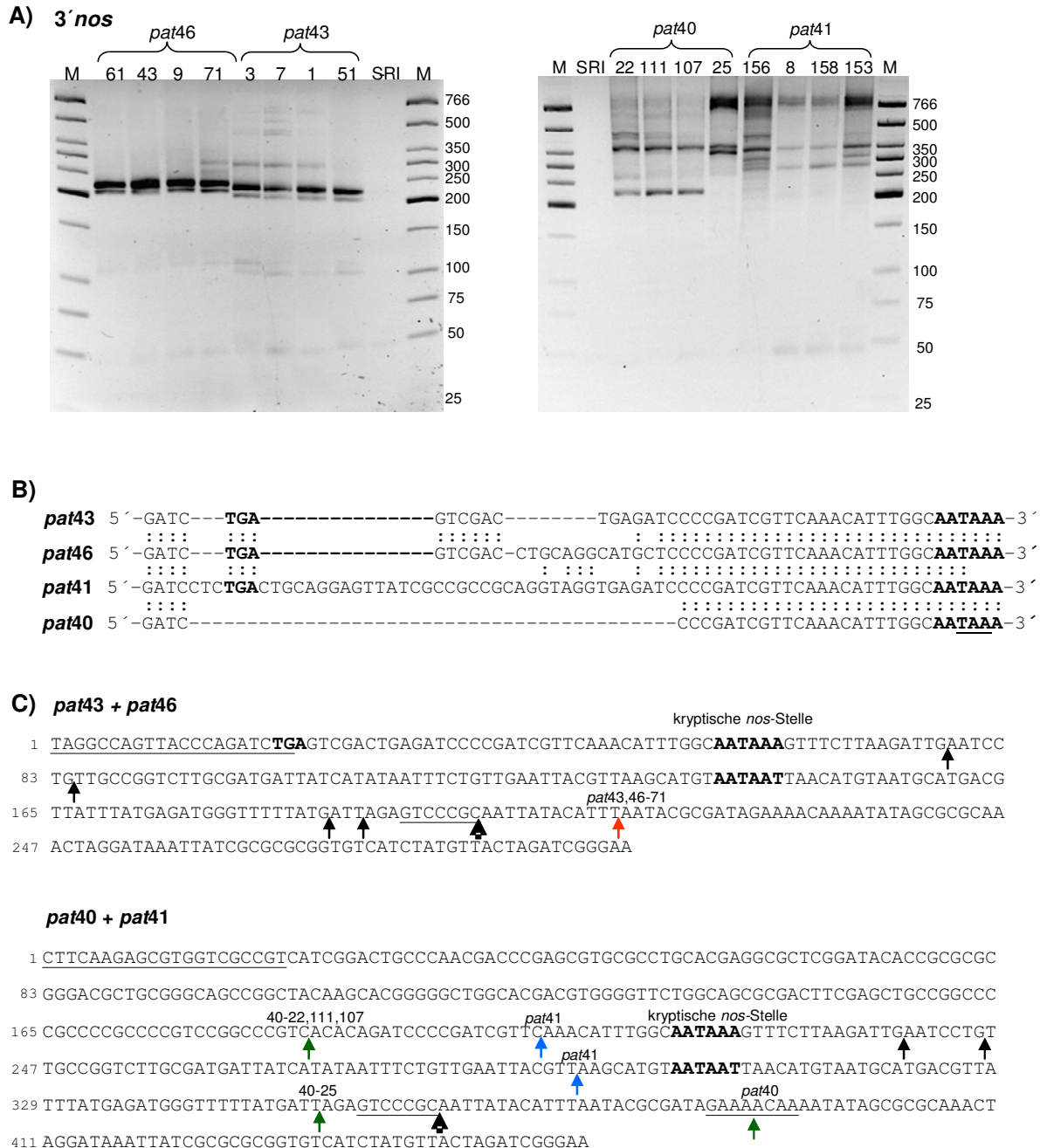


Abb. 14: Charakterisierung der *pat* 3' Transkriptenden in verschiedenen *pat* Pflanzen, die den 3'*nos* enthalten.

A) Auftrennung von RT-PCR-Fragmenten verschiedener *pat* Pflanzen amplifiziert mit *patS*-3'fw- bzw. 41-20 und OligodT-rv Primern in 4 % (w/v) Agarosegel. B) Sequenzunterschiede der 3' UTR. C) Sequenz des 3'*nos*. TC und AATAAA-ähnliche Sequenzen sind fett dargestellt. Major CS mit fetten, schwarzen Pfeil angezeigt, Minor CS sind mit dünnen schwarzen Pfeilen markiert. Zusätzliche CS im *pat43* 3'*nos* mit rotem Pfeil, im *pat41* 3'*nos* mit blauem und im *pat40* 3'*nos* mit grünem Pfeil markiert. Unterstrichene Sequenz am 5'-Ende der Fragmente kennzeichnen die Bindestellen des forward Primers. M, Low Molecular DNA Ladder (NEB).

Der größte Unterschied zu den *pat46*- und *pat43* Linien liegt jedoch darin, dass in den *pat41* Linien die Mehrzahl der Transkripte stromabwärts des 3′*nos* Fragments polyadenyliert wurden. Auch in den *pat40* Linien wurden CS 3′ des Terminatorfragments detektiert, der Anteil war jedoch mit Ausnahme der Linie 40-25 geringer.

Die höchste Heterogenität der *pat* mRNA 3′-Enden lässt sich in den *pat51* Linien erkennen, deren *pat* Gen das 3′*camvantisense* Fragment enthält. Die Polyadenylierung findet an verschiedenen Stellen statt, wobei keine Präferenz für eine CS erkennbar ist. Auch der 3′*nos* und 3′*ocs* zeichneten sich durch die Verwendung von multiplen CS aus, von denen die meisten bereits in der Literatur beschrieben sind. Abhängig vom verwendeten *pat* Gen kam es in Verbindung mit dem 3′*nos* jedoch zu einer unterschiedlichen Verwendung der CS. So entstanden in den *pat41*-, *pat40*- und *pat43* Pflanzen auch Transkripte, deren CS 3′ des *nos* Fragmentes lokalisiert sind. Für den 3′*camv* konnte dagegen stets nur die Verwendung der ‘Major CS’ detektiert werden, unabhängig von der übrigen *pat* Gensequenz.

C1.8 Inter-Transformant-Variationen korrelieren nicht eindeutig mit der Kopienzahl des integrierten *pat* Transgens

Die Ergebnisse aus qRT-PCR und Pat-ELISA offenbarten, dass es nicht nur zwischen den verschiedenen *pat* Genen starke Variationen gibt, sondern z. T. auch zwischen verschiedenen Linien, die dasselbe *pat* Gen beinhalten. Diese Inter-Transformant-Variabilität schwankt stark innerhalb der verschiedenen *pat* Gene. Zum einen wurden für die Konstrukte *patOCA*, *pat51* und *pat41* mit 2,7- bis 3,4-fachen Expressionsunterschieden geringe Inter-Transformant-Variationen auf Proteinebene festgestellt. Zum anderen wurden für die *pat* Konstrukte *pat46* und *pat45* eine 10-fach höhere Variabilität um das 22,9- und 34,1-fache zwischen den unabhängigen Linien identifiziert. Die Variabilität lässt sich auch mittels des Variationskoeffizienten (CV; Tabelle 6) wiedergeben. So konnte auf Proteinebene ein CV zwischen 39 % für *pat51* Linien und 97 % für *pat45* Linien berechnet werden.

Tabelle 6: Inter-Transformant-Variabilität für die *pat* Konstrukte im Pat Protein ‘steady state level’.

<i>pat</i> Gen	<i>patOCA</i>	<i>pat41</i>	<i>pat40</i>	<i>pat43</i>	<i>pat44</i>	<i>pat45</i>	<i>pat46</i>	<i>pat49</i>	<i>pat50</i>	<i>pat51</i>
MW	746,00	6,29	7,01	30,08	29,20	24,58	41,55	7,65	525,23	0,43
SD	308,66	2,51	2,87	17,23	24,98	23,87	35,40	4,22	238,46	0,17
CV (%)	41	40	41	57	86	97	85	55	45	39

MW, Mittelwert der Pat Konzentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ Pat/TSP; SD, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient (Quotient aus SD und MW in %)

Variationen im Expressionslevel werden mit verschiedenen Faktoren assoziiert, zu denen u. a. die physiologische Variabilität gehört (z. B. Jones et al., 1987; Dean et al., 1988). Um den Einfluss der physiologischen Variabilität auf ein möglichst geringes Maß zu reduzieren, wurden die Kultivierungsbedingungen standardisiert. Die Bestimmung des CV zwischen Klonen von verschiedenen transgenen Linien, die unter solchen standardisierten Bedingungen kultiviert wurden, sollte Auskunft darüber geben, ob dies gelungen ist. Die Koeffizienten liegen hier für die Protein ‘steady state level’ unter 27 % (Tabelle 7), und damit z. T. deutlich unter den Inter-Transformant-Variabilitäten der verschiedenen Konstrukte.

Tabelle 7: Intra-Transformant-Variabilität im Pat Protein ‘steady state level’ für verschiedene *pat* Linien.

<i>pat</i> Linie	OCA-58	OCA-60	40-31	41-158	43-17	44-18	45-112	46-68
Klon 1*	318,0	580,0	4,6	5,3	12,2	81,6	3,4	96,9
Klon 2*	270,0	686,5	6,2	7,7	16,4	78,4	3,2	110,7
Klon 3*	349,0	714,8	7,0			80,7		
CV (%)	13	11	21	26	21	2	4	9

*, Pat Konzentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ Pat / TSP; CV, Variationskoeffizient (Quotient aus SD und MW in %)

Um zu ermitteln, ob das Expressionslevel mit der Anzahl der in das Pflanzengenom integrierten Transgenkopien assoziiert ist, wurden zwischen 5 und 18 unabhängige Linien pro Konstrukt mittels Southern Blot-Analysen auf ihre Kopienzahl untersucht. Die Bestimmung der Kopienzahl erfolgte durch Verdau der Pflanzen-DNA in jeweils zwei verschiedenen Ansätzen mit geeigneten Restriktionsenzymen (siehe Anhang F1), die jeweils nur einmal im *pat* Gen schneiden. Die Schnittstelle lag jedoch außerhalb des Bereichs der Hybridisierung mit der Sonde, damit für jede Kopie nicht mehr als ein Signal im Southern Blot detektiert wird. Die Hybridisierungen wurden mit circa 0,5 kb großen *patS*- bzw. *pat41*-spezifischen DIG-markierten Sonden durchgeführt. Zum größten Teil befanden sich eine und zwei Kopien des *pat* Transgens im Genom der untersuchten Tabaklinien (siehe Anhang F4). Dies ist nicht nur der Fall für *pat*OCA- und *pat*51 Linien, die auf Proteinebene wenig im Expressionslevel variierten, sondern auch für *pat*45 Linien mit der höchsten Inter-Transformant-Variabilität.

Lediglich unter den *pat*46 Linien konnten Individuen mit mehr als 4 Kopien des *pat* Transgens ausgemacht werden. Insgesamt konnte keine durchgehend positive oder negative Korrelation zum *pat* Expressionslevel beobachtet. So enthalten z. B. die vier *pat*46 Linien mit dem höchsten Pat-Protein ‘steady state level’ (Linie 61, 68, 71 und 90) eine, drei bzw. vier Kopien des *pat* Transgens (Abb. 15). Es wird jedoch auch deutlich, dass die Pflanzen mit der geringsten *pat* Expression innerhalb eines Konstrukts stets mehr als eine *pat* Kopie aufwiesen.

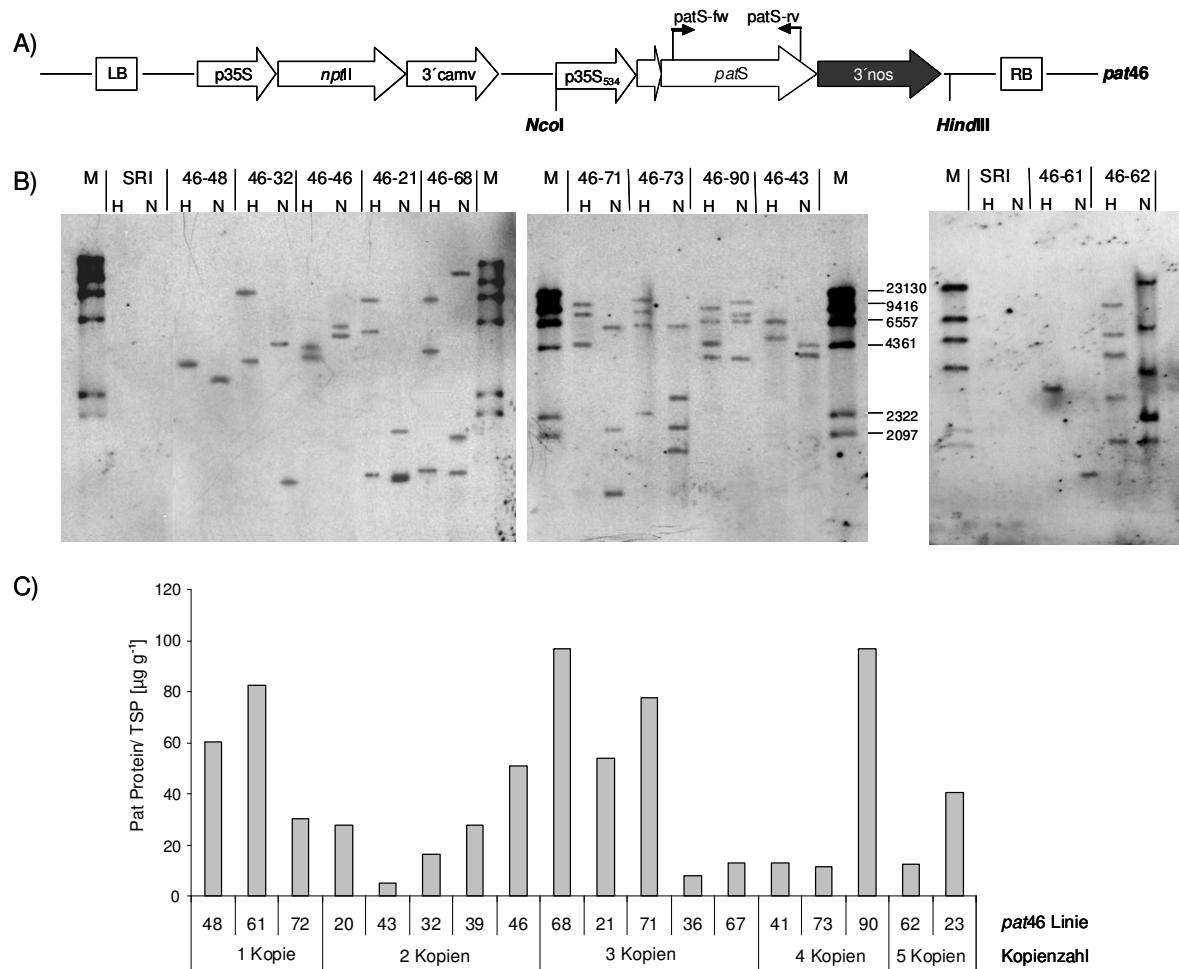


Abb. 15: Einfluss der Kopienzahl auf das *pat* Expressionslevel für *pat46* Linien.

A) Southern Blot-Analyse einiger *pat46* Linien. 25 μg DNA wurden mit *HindIII* (H) bzw. *NcoI* (N) verdaut, mit Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt und mit einer *patS*-spezifischen, DIG-markierten Sonde detektiert. B) Verhältnis Pat Protein pro TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$) gemessen mit Pat-ELISA für repräsentative *pat46* Linien im Verhältnis zur Kopienzahl des *pat* Transgens. M: Molecular weight marker II (Roche)

Insgesamt gibt es in den transgenen Linien keine eindeutige und durchgehende positive oder negative Korrelation zwischen der Kopienzahl des *pat* Transgens und der Höhe der *pat* Expression.

C1.9 Einfluss der unterschiedlichen 5'- und 3' UTRs der verschiedenen *pat* Gene auf die mRNA Stabilität

Die Verwendung unterschiedlicher 5'- und 3' UTRs führte in Tabak teilweise zu starken Unterschieden im mRNA 'steady state level' der verschiedenen *pat* Transkripte. Diese könnten u. a. durch Variabilität in den mRNA Stabilitäten beeinflusst sein. Das Maß der mRNA Stabilität ist ihre Halbwertszeit, d. h. der Zeitraum bis die Hälfte der ursprünglich vorhandenen RNA abgebaut wurde. Die Analyse der mRNA Halbwertszeit erfolgte nach dem Protokoll von Klaff & Gruissem (1991) an voll entwickelten Tabakblättern mithilfe von

Actinomycin D ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$). Actinomycin D (ActD) ist ein Peptid-Antibiotikum aus *Streptomyces parvulus*, das die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Interkalation der Guanin-Nukleotide der DNA hemmt (Wadkins et al., 1996). Dadurch wird die Transkription unterbunden, sodass die Abbaurate der bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen *pat* RNA bestimmt werden kann. Nach 30-minütiger Vorinkubation, deren Ende als Zeitpunkt 0 definiert wurde, erfolgten die Probenahmen an bestimmten Zeitpunkten von 30 Minuten bis 10 Stunden. Da für die Anzahl der Zeitpunkte nicht ausreichend vergleichbares Blattmaterial an einer Pflanze vorhanden ist, wurden mindestens 8 Klone einer Linie für die Analyse herangezogen. Um einen Einfluss möglicher *pat* mRNA Variabilität zwischen den verschiedenen Klonen auszuschließen, wurde das Blatt, welches dem mit ActD behandelten Blatt gegenüberliegt, für den gleichen Zeitraum ohne ActD behandelt. Die ermittelten *pat* Transkriptmengen der verschiedenen Probezeitpunkte in den mit ActD behandelten Blättern wurden anschließend von denen ohne ActD abgezogen. Aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber der Northern Blot Analyse erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR (Banerjee et al., 2009). Als internes Referenzgen diente hier das 18S rDNA Gen, da ribosomale RNAs zu den stabilsten gehören (Defoiche et al., 2009). Zur Berechnung wurden hier Emissionswerte eines definierten PCR Zyklus herangezogen, bei denen sich die PCR Reaktion im linearen Bereich befinden. Für die 18S rRNA wurde Zyklus 17 ausgewählt, für die *pat* RNA variierte die Zykluszahl in Abhängigkeit von der Grundexpression zwischen 19 Zyklen für *pat*OCA und 28 Zyklen für *pat*51. Innerhalb eines Experimentes war für manche definierte Zeitpunkte die PCR Reaktion für das Referenzgen im Zyklus 17 nicht im linearen Bereich. Diese Zeitpunkte wurden aus der Bestimmung herausgenommen. Mithilfe einer Regressionsanalyse wurde schließlich die Halbwertszeit der *pat* mRNA in den analysierten Pflanzen berechnet.

Für die Konstrukte *pat*OCA, *pat*50 und *pat*51 wurden jeweils für zwei unterschiedliche Linien die Halbwertszeit bestimmt. Für das Konstrukt *pat*46 erfolgte die Bestimmung für zwei unterschiedliche Geschwister der Linie 61. Für die Konstrukte *pat*43, *pat*44 und *pat*45 wurde jeweils nur eine Linie hinsichtlich ihrer Halbwertszeit untersucht. Mit Ausnahme der *pat*51 RNA konnte mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme der spezifischen *pat* mRNA in den mit ActD behandelten Blättern detektiert werden, wodurch bestätigt wird, dass wirksames ActD in die Zellen der Tabakblätter aufgenommen wurde. Die berechneten Halbwertszeiten variierten zwischen 4 und 7 h (Abb. 16). Dabei war der Unterschied zwischen den zwei *pat*50 Linien größer als zwischen den verschiedenen Konstrukten. Für die *pat*50 Linie 33 konnte eine Halbwertszeit von 4,2 h, für die Linie 13 von 7,0 h berechnet

werden. Bei den übrigen Konstrukten lag die Halbwertszeit zwischen 4,1 h für die *patOCA* Linie 67 und 5,4 h für die *pat43* Linie 3f.

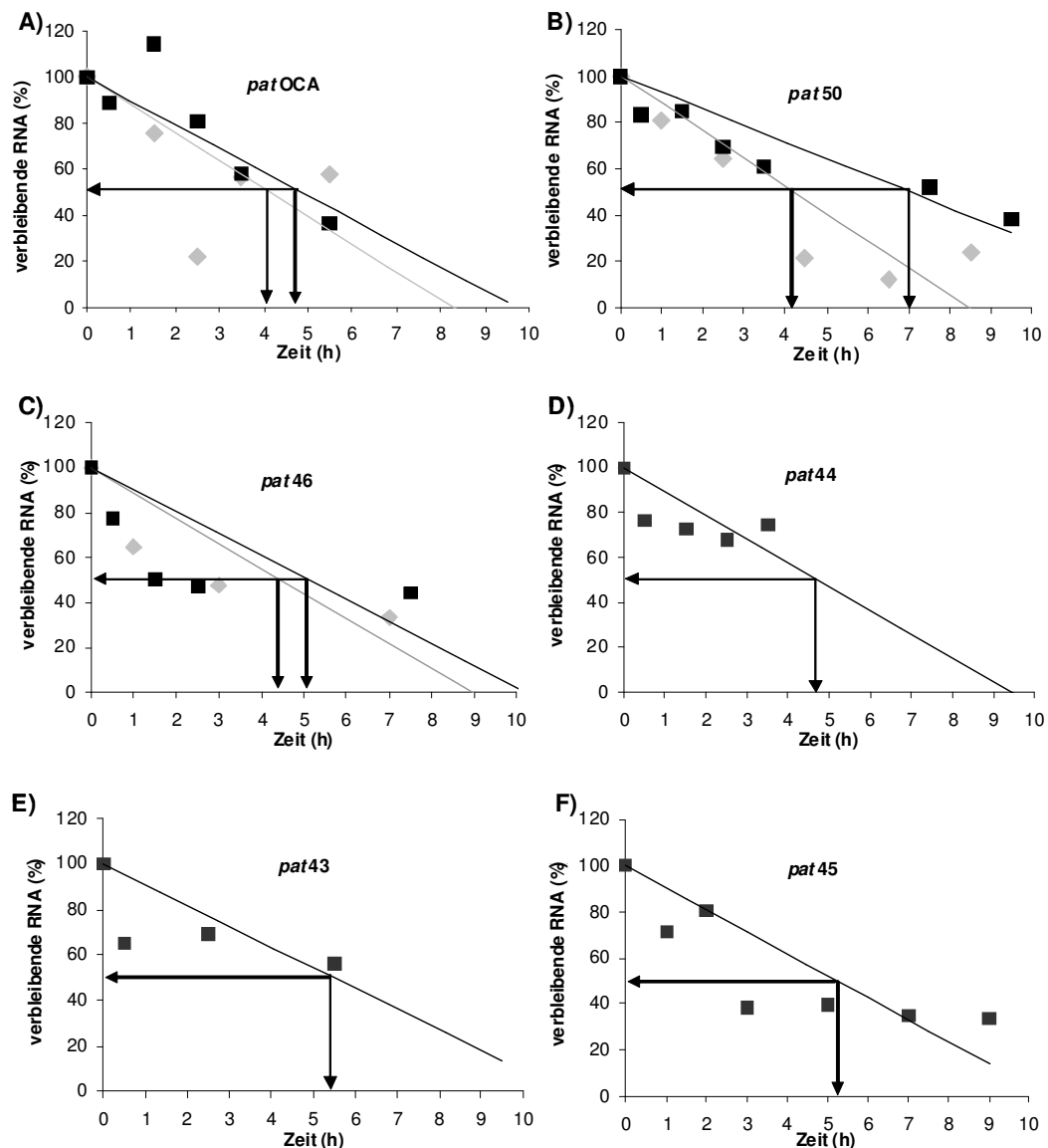


Abb. 16. Einfluss der UTR Sequenzen auf die *pat* mRNA Stabilität.

mRNA-Halbwertszeitbestimmung für jeweils 2 *patOCA* (A), *pat50* (B), *pat46* (C) Tabakpflanzen (eine Pflanze mit hellgrauen, die andere mit dunkelgrauen Symbolen dargestellt), sowie eine *pat44* (D), *pat43* (E) und *pat45* (F) Tabakpflanze. Die Hemmung der Transkription erfolgte mit ActD ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$), die Analyse mittels qRT-PCR unter Normalisierung mit der 18S rRNA. Der Prozentsatz der verbleibenden RNA ist relativ zur RNA Menge zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 0). Pfeile stellen die Zeitpunkte dar, an denen ca. 50 % der RNA Menge zu Zeitpunkt 0 verbleibt.

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Verwendung der unterschiedlichen 5' UTRs auf die Stabilität detektiert werden. Die durchschnittliche Halbwertszeit lag für die *patOCA* mRNA (5' UTRS) bei 4,5 h und für die *pat44* mRNA (5' UTR41) bei 5,3 h. Die *patOCA* mRNA akkumuliert jedoch zu deutlich höheren Mengen als die *pat44* RNA.

Ähnliches lässt sich auch für die Verwendung der verschiedenen Transkriptionsterminatoren erkennen. Der Vergleich der *patOCA* (3'*camv*) und der *pat46* (3'*nos*) mRNA Stabilität zeigt

auch hier kaum Unterschiede (4,5 h vs. 4,8 h), dennoch akkumuliert die *patOCA* RNA zu 8-fach höheren Mengen. Auch in Kombination mit der 5' UTR41 (*pat50-3'camv* und *pat43-3'nos*) konnten sehr ähnliche mRNA-Halbwertszeiten berechnet werden (5,6 h vs. 5,5 h), und auch hier akkumuliert die *pat50* mRNA zu deutlich höheren Mengen als die *pat43* mRNA.

Der Vergleich der Halbwertszeiten für *pat* RNAs, die sich in der 3' UTR unterscheiden (*patOCA* vs. *pat45* bzw. *pat44* vs. *pat50*) konnte ebenfalls keinen wesentlichen Einfluss auf die mRNA Stabilität feststellen. So lagen die durchschnittlichen Halbwertszeiten für die 4 *pat* RNAs zwischen 4,5 h und 5,6 h.

Im Gegensatz zu den anderen Konstrukten wurde für *pat51* keine kontinuierliche Reduktion der RNA mit zunehmender Inkubationszeit mit ActD gemessen (Abb. 17). Die Expression in den *pat 51* Linien war so gering, dass die PCR-Reaktion erst nach doppelt so vielen PCR-Zyklen wie für die *patOCA* Linien im linearen Bereich lag. Für die zwei *pat51* Linien 3 und 12 wurden die höchsten RNA Mengen nach 2,5 h detektiert. Die RNA Level an den meisten anderen Zeitpunkten variierten dagegen nur wenig. Eine Bestimmung der Halbwertszeit für die *pat51* Linien war mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

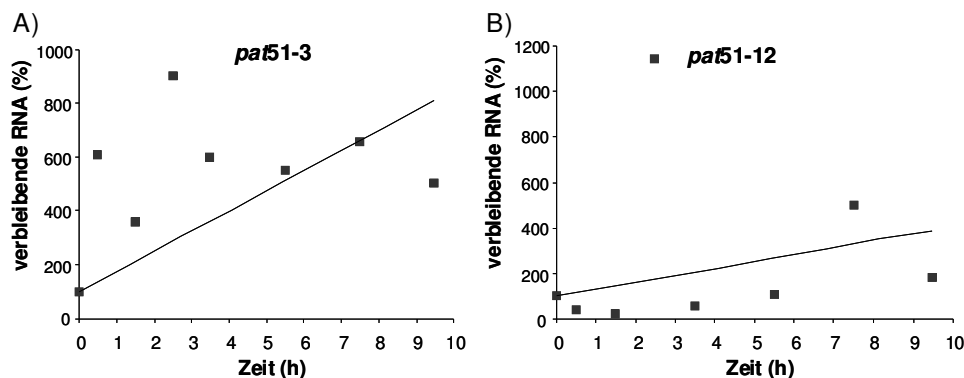


Abb. 17. Bestimmung der *pat51* mRNA Halbwertszeit in den *pat51* Linien 3 (A) und 12 (B).

mRNA-Halbwertszeitbestimmung für die *pat51* Linien 3 (A) und 12 (A). Die Hemmung der Transkription erfolgte mit ActD ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$), die Analyse mittels qRT-PCR unter Normalisierung mit der 18S rRNA. Der Prozentsatz der verbleibenden RNA ist relativ zur RNA Menge zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 0).

Insgesamt konnte in Verbindung mit den unterschiedlichen 5'- und 3' UTRs sowie dem 3'*camv* oder 3'*nos* nur geringe Unterschiede in den gemessenen mRNA-Halbwertszeiten detektiert werden, die keine Korrelation zu den mRNA 'steady state level' erkennen lassen. Für die *pat51* RNA, die zu sehr geringen Mengen akkumuliert wird, konnte die Halbwertszeit nicht bestimmt werden.

C2 Einfluss *cis*-regulatorischer Sequenzen des Herbizidresistenzgens *pat* auf das mRNA- und Protein ‘steady state level’ unter optimalen Wachstumsbedingungen in Kartoffel

Zusätzlich zum Tabak sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen 5′- und 3′ UTRs auch in Kartoffel einen Einfluss auf das Expressionsniveau ausüben. Bereits Stefanie Walter transformierte die Kartoffelsorte Albatros (Norika) mit den *pat* Genen *pat40* bis *pat45* sowie *patOCA* (siehe Tabelle 1) mittels *Agrobacteriumtumefaciens*-vermittelten Gentransfer. Der Versuchsaufbau war analog zu dem für Tabak. Für die Hitzestressversuche wurden von jedem zu testenden Event jeweils mehrere Klone in getrennten Pflanzencontainern bei 24 °C angezogen. Nach 2 bis 3 Wochen waren die Klone gut bewurzelt und hatten ausreichend Blattmaterial ausgebildet. Jeweils einer der beiden Pflanzencontainer wurde weiter bei 24 °C kultiviert, während der andere in einer Klimakammer bei 37 °C für 10 Tage mit vergleichbaren Lichtverhältnissen gestellt wurde. Anschließend wurden für die Analysen jeweils ganze, voll entfaltete aber nicht seneszente Kartoffelblätter beprobt. Die Klone, die ausschließlich bei 24 °C kultiviert wurden, dienten sowohl als Kontrollen für die Hitzestressversuche, als auch als Untersuchungsmaterial für die Analysen zum *pat* Expressionslevel unter optimalen Wachstumsbedingungen.

C2.1 Verschiedene *pat* Genvarianten führen auch in Kartoffel zu signifikanten Unterschieden im mRNA- und Protein ‘steady state level’

Die transgenen Events wurden in der T₀-Generation mit allen auch für Tabak angewendeten qualitativen und quantitativen Methoden untersucht um die durchschnittlichen mRNA- und Protein ‘steady state level’ zu bestimmen.

Auch hier wurden teils starke Unterschiede in der Expression der verschiedenen *pat* Konstrukte bereits mithilfe der nicht quantifizierenden Methoden RT-PCR, Western Blot und Enzymaktivitätstest deutlich (Abb. 18).

Die Quantifizierung der *pat* mRNA Gehalte mittels qRT-PCR und Proteinkonzentrationen mithilfe des Pat-ELISA bestätigten die z. T. signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen *pat* Genen. So zeichneten sich die drei *patOCA* Events durch die stärkste - und die drei *pat41* Events durch die geringsten mRNA ‘steady state level’ aus (Abb. 19). Die durchschnittlichen mRNA Gehalte der *pat40*- sowie *pat43*-, *pat44*- und *pat45.2*-Events dagegen sind vergleichbar. Die Proteinkonzentrationen der *pat43*-, *pat44*- und *pat45.2*-Events

unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander, während die der *pat40* Events signifikant geringer ist, und sich der Proteinkonzentration der *pat41* Events annähert.

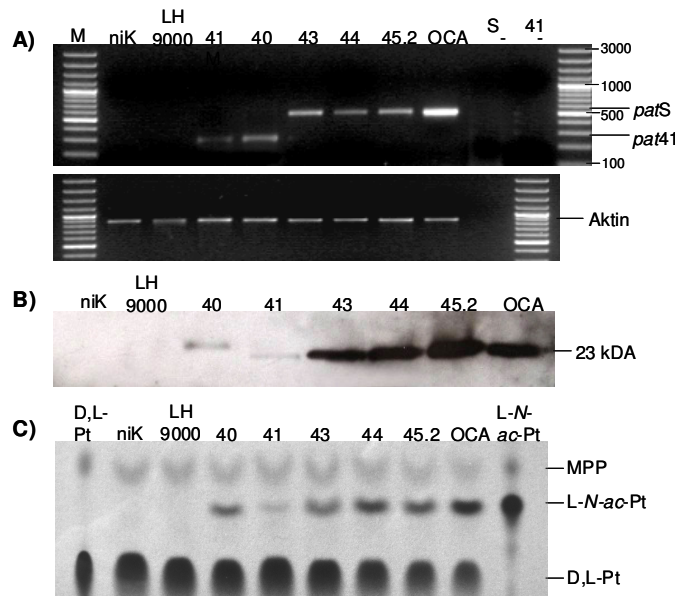


Abb. 18: Vergleich der *pat* Expressionsmuster der analysierten *pat* Gene in Kartoffel.

A) RT-PCR von repräsentativen Vertretern der *pat* Gene. Spezifische *patS* (528 bp)- und *pat41* (282 bp)- Fragmente wurden mithilfe spezifischer Primer amplifiziert. Ein 876 bp *actin* Fragment dient als Kontrolle für gleich eingesetzte RNA-Mengen. S- und 41- bezeichnen jeweils die Negativkontrollen.

B) Western Blot von repräsentativen Vertretern der *pat* Gene. 30 (*pat*OCA)- bzw. 100 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE (15 % Polyacrylamidgel) aufgetrennt, auf eine ECL-Hybond-Membran (GE Healthcare) übertragen und mittels ECL-Chemilumineszenz visualisiert.

C) Analyse der PAT-Enzymaktivität in repräsentativen Vertretern der *pat*-Gene. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. niK bezeichnet die nahe isogene Kontrolle, LH9000 den leeren Transformationsvektor; 40 bis 45 und OCA die Repräsentanten der *pat* Gene *pat40* bis *pat45.2*. MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure

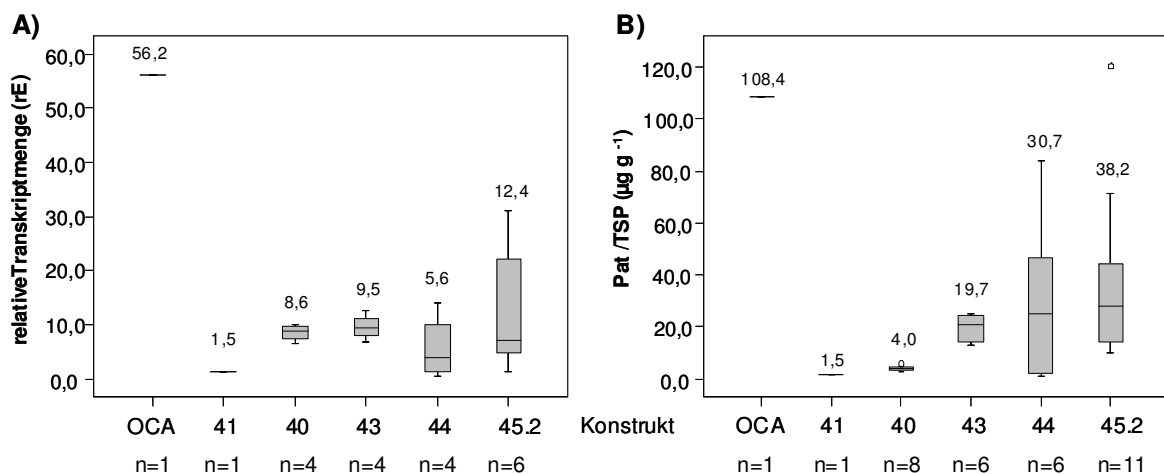


Abb. 19: Durchschnittliche *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' für alle *pat* Gene in Kartoffel.

Boxplot der durchschnittlichen A) mRNA- und B) Proteinkonzentrationen aus Messungen von bis zu 11 unabhängigen Linien pro *pat* Gen mittels qRT-PCR oder Pat-ELISA. Die Transkriptmenge ist angegeben in relativen Einheiten (rE), Protein als Verhältnisses Pat/TSP in µg g⁻¹. OCA und 40 bis 45 kennzeichnen die *pat* Gene *pat40* bis *pat45.2* und *pat*OCA.

Aufgrund der geringen Inter-Transformant-Variabilitäten, die für einige *pat*-Konstrukte gemessen werden konnten, wurden Kopienzahlbestimmungen durchgeführt. Damit sollte nachgewiesen werden, dass es sich jeweils tatsächlich um unabhängige Events handelt. Des Weiteren sollten mithilfe der Southern Blot Analysen ermittelt werden, ob in Kartoffel eventuell unterschiedliche Kopienzahlen, für die andererseits starken Expressionsunterschiede verantwortlich sein könnten.

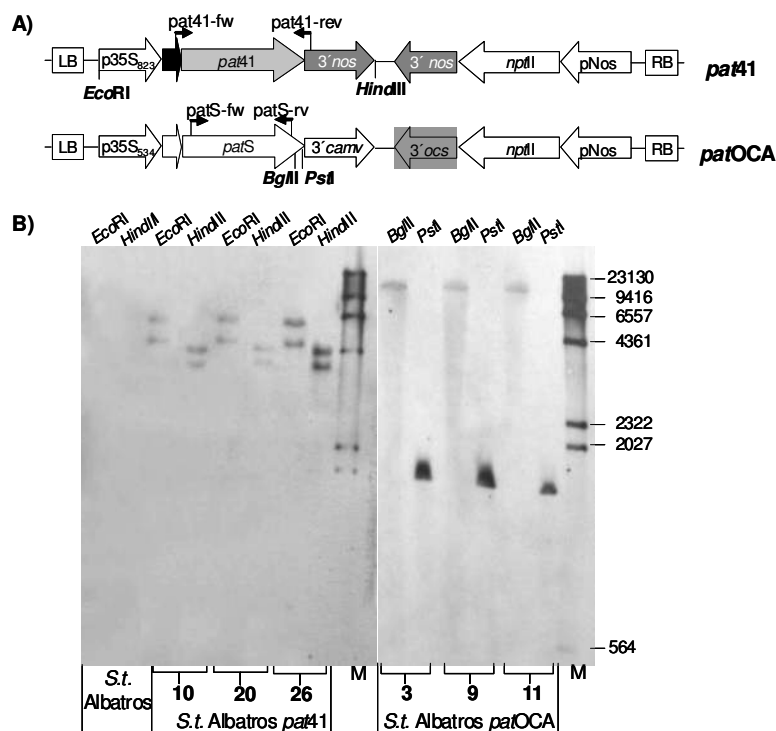


Abb. 20: Southern Blot Analyse zur Ermittlung der Kopienzahl von *patOCA*- und *pat41* Kartoffel-Events.

A) Restriktionsschnittstellen und Sondenbindung für *pat41*- und *patOCA* Gen. B) Southern Blot-Analyse der *pat41* und *patOCA* Events. 25 µg DNA wurden mit *EcoRI* oder *HindIII*, bzw. *BglII* oder *PstI* verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese mit 1 % Agarose in 0,5x TBE aufgetrennt und mit DIG-markierter *patS*- bzw. *pat41*-Sonde detektiert. M: Molecular weight DNA marker II (Roche)

Die Kopienzahlbestimmungen ergaben, dass es sich bei den drei analysierten *pat41*- und *patOCA* Events jeweils nur um ein einziges Event handelt (Abb. 20). Damit können die vergleichbaren mRNA- und Protein 'steady state level' begründet werden. Auch in den Konstrukten *pat40* und *pat43* zeigten übereinstimmende Bandenmuster der Southern Blot Analyse an, dass es sich bei einigen analysierten Pflanzen um jeweils dasselbe Event handelt (Übersicht siehe Anhang F5).

Für die untersuchten Kartoffel-Transformanten konnten zwischen einer und drei Kopien des *pat* Transgens identifiziert werden. Ein Einfluss der Kopienzahl auf das Expressionsniveau ist nicht feststellbar. Dies wird insbesondere bei den *pat44*- und *pat45.2*-Events deutlich (Abb. 21). Trotz unterschiedlichen Pat Proteingehaltes um das mehr als 20-fache zwischen den *pat44* Events 17 und 21 tragen beide jeweils nur eine Kopie. Unter den *pat45.2* Events wurde für das Event 66 mit zwei Kopien die höchste Expression detektiert. Andere Events mit zwei

Kopien (42, 53, 67) wiesen jedoch nicht mehr Pat Protein auf als Events mit nur einer Kopie (7, 8, 59).

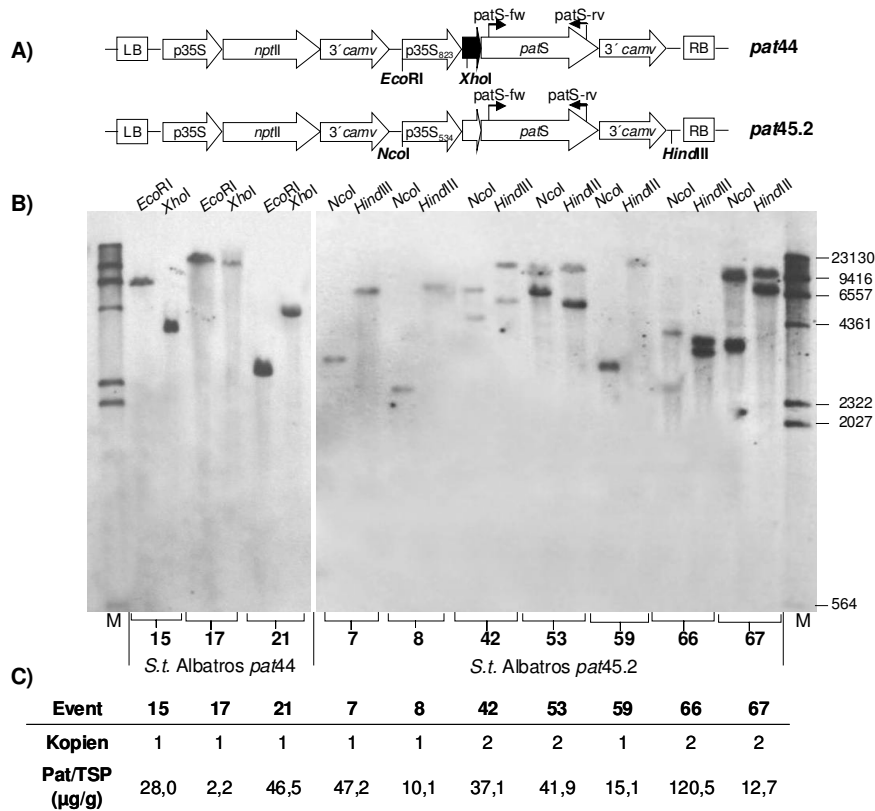


Abb. 21: Einfluss der Kopienzahl auf das Pat-ProteinExpressionslevel für *pat44*- und *pat45.2* Events.

A) Restriktionsschnittstellen und Sondenbindung für *pat44*- und *pat45.2* Gen. B) Southern Blot-Analyse einiger *pat44*- und *pat45.2* Events. 25 µg DNA wurden mit *EcoRI* bzw. *XhoI*, sowie *HindIII* bzw. *NcoI* verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose) aufgetrennt und mit *patS*-spezifischer, DIG-markierter Sonde detektiert. C) Pat Protein Konzentration in µg g⁻¹ TSP gemessen mit Pat-ELISA für *pat44*- und *pat45.2* Events im Verhältnis zur Kopienzahl des *pat* Transgens. M: Molecular weight DNA marker II (Roche)

Auch in Kartoffel wurde zwischen den Klonen mit einem CV von bis zu 35 % zumeist nur eine geringe Variabilität der Pat Proteingehalte deutlich (Tabelle 8).

Tabelle 8: Intra-Transformant-Variabilität im Protein 'steady state level' einiger Kartoffelevents.

<i>pat</i> Event	OCA-3	41-10	40-36	40-62	43-55	43-12	44-15	45.2-7
Klon 1*	96,9	1,8	4,6	4,0	18,0	18,7	28,0	47,2
Klon 2*	115,2	1,5	4,4	3,3	29,6	16,9	21,2	47,2
Klon 3*	113,2	1,2	2,8					59,4
CV (%)	9	22	25	14	35	7	20	14

*, Pat Konzentration in µg g⁻¹ Pat/TSP; CV, Variationskoeffizient (Quotient aus SD und MW in %)

Dagegen gab es wie in Tabak auch zwischen Kartoffel Events, die dasselbe *pat* Gen enthalten, teilweise große Unterschiede im Expressionslevel. In Kartoffel wurde zwar nicht immer dieselbe Anzahl von unabhängigen Events analysiert wie in Tabak, dennoch ist eine ähnliche

Tendenz erkennbar. So ist Inter-Transformant-Variabilität der gemessenen *pat40*- und *pat43* Events relativ gering (Faktor von weniger als 2,4) im Vergleich zu den *pat45.2*- und *pat44* Events, die um das 12– bis 70-fache in ihren spezifischen Proteingehalten variieren. Die Variabilität innerhalb der Konstrukte wird auch mittels des CV deutlich (Tabelle 9). Dieser ist zwischen den *pat44* Events am größten mit mehr als 100 % und zwischen den *pat40* Events am kleinsten mit einem CV unter 25 %.

Tabelle 9: Inter-Transformant-Variabilität im Protein ‘steady state level’ aller *pat* Gene in Kartoffel.

<i>pat</i> Gen	<i>patOCA</i>	<i>pat41</i>	<i>pat40</i>	<i>pat43</i>	<i>pat44</i>	<i>pat45.2</i>
MW	-	-	3,99	19,67	30,70	38,24
SD	-	-	0,97	5,33	31,06	33,09
CV (%)	-	-	24	27	101	87

MW, Mittelwert der Pat Konzentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ Pat/TSP; SD, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient

Die höchsten *pat* mRNA- und Protein ‘steady state level’ konnten wie bei Tabak im transgenen *patOCA* Event detektiert werden. Das *patOCA* Event enthält jedoch ca. 7-mal weniger spezifische *pat* mRNA ($56,2 \pm 2,5$ rE) und Pat Protein ($108,4 \pm 5,8 \mu\text{g g}^{-1}\text{TSP}$) als in Tabak. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei einer höheren Anzahl transgener Events die durchschnittlichen mRNA- und Protein ‘steady state level’ sich denen in Tabak annähern könnten. Es gibt in Tabak jedoch keine *patOCA* Linie, die vergleichbare *pat* mRNA- und Protein ‘steady state level’ wie das Kartoffel-Event aufweisen. In Tabak wurde mindestens doppelt so viel spezifische RNA und mindestens 4-mal mehr Pat Protein gemessen als im Kartoffel-Event.

Das *pat41*- und die *pat40* Events, die den bakteriellen Kodierbereich beinhalten, sind im Vergleich zu den übrigen *pat* Genen durch eine signifikant geringere Pat Proteinkonzentration charakterisiert ($1,50$ und $3,99 \pm 0,97 \mu\text{g g}^{-1}\text{TSP}$). Sie ist auch im Vergleich zum Tabak leicht, jedoch nicht signifikant reduziert. Dagegen zeichnet sich nur das *pat41* Event auch durch einen signifikant reduzierten *pat* mRNA-Gehalt aus ($1,46 \pm 0,36$ rE). Dieser ist jedoch vergleichbar mit dem der für die *pat41* Tabaklinien gemessen werden konnte ($1,54 \pm 0,49$ rE). Der durchschnittliche *pat* mRNA-Gehalt der *pat40* Events ist mit $8,6 \pm 0,7$ rE ebenfalls vergleichbar mit dem in Tabak ($7,2 \pm 1,7$ rE). Die *pat40* mRNA akkumuliert somit zu einer beinahe 6-fach höheren Menge als die *pat41* mRNA. Eine höhere Akkumulation der *pat40* mRNA konnte auch in Tabak beobachtet werden.

Die *pat* mRNA Konzentrationen der anderen drei Konstrukte sind in den Kartoffel-Events ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zu denen in den SRI Tabaklinien. So konnte ich ca.

doppelt so viel *pat43*- und *pat45* mRNA und in etwa gleich viel *pat44* mRNA in den Kartoffel-Events im Vergleich zum Tabak detektieren. Äquivalent zu den ähnlichen mRNA Gehalten unterscheidet sich auch der Pat Proteingehalt dieser Konstrukte kaum von dem in den Tabaklinien. In den *pat43* Events liegt er nur leicht unter dem in Tabak ($19,7 \pm 2,2$ vs. $30,1 \pm 5,5 \mu\text{g g}^{-1}\text{TSP}$), in den *pat45.2* Events leicht darüber ($38,2 \pm 9,9$ vs. $24,6 \pm 7,5 \mu\text{g g}^{-1}\text{TSP}$), in den *pat44* Events ist er vergleichbar ($30,7 \pm 12,7$ vs. $29,2 \pm 7,9 \mu\text{g g}^{-1}\text{TSP}$).

Im Allgemeinen konnte in Kartoffel unter normalen Kultivierungsbedingungen ein ähnlicher Einfluss der verschiedenen *pat* Genregionen auf die Expression festgestellt werden wie in Tabak. Die Kombination aus 5' UTRS, 3' UTRS und 3'*camv* im *patOCA* Gen verursacht die signifikant stärkste Expression des *pat* Gens. Ein Austausch durch die 5' UTR41 (*pat44* Gen) oder 3' UTR41 (*pat45* Gen) führt zu signifikanten Reduktionen der *pat* mRNA und des Pat Proteins.

C3 Einfluss *cis*-regulatorischer Sequenzen auf das *pat*-mRNA- und Protein 'steady state level' unter Hitzestressbedingungen in Tabak

Köhne et al. (1998) konnten zeigen, dass die Kombination aus 5' UTR41, verlängertem 3' UTR und *nos* Terminator im *pat41*- und *pat43* Gen zum Verlust des Pat Proteins nach einer 5- bis 10-tägigen 37 °C-Behandlung führt. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob für diese hitzeinduzierte Transgeninaktivierung die Präsenz aller drei Elemente, unterschiedliche Kombinationen der Elemente oder nur eines einzelnen notwendig ist. Für die Analyse der an der hitzeinduzierten Transgeninaktivierung beteiligten Elemente wurde eine Reihe von *pat* Genen konstruiert. Die Analysen des Verhaltens nach Hitzestress erfolgte auf Proteinebene vornehmlich mithilfe der Western Hybridisierung und des enzymatischen Aktivitätstests, da diese Methoden die relativen Pat-Gehalte zwischen Kontroll- und hitzebehandelten Proben sehr gut beurteilen lassen. Pat-ELISA-Analysen, die in Stichproben durchgeführt wurden, bestätigten durchgehend die Ergebnisse aus Western Hybridisierung und Enzymaktivitätstest. Die relativen mRNA Gehalte wurden zunächst mithilfe der Northern Hybridisierung analysiert. Da es jedoch für Linien mit schwacher Expression Schwierigkeiten bei der Detektion der spezifischen *pat* RNA gab, wurde im Laufe dieser Arbeit die quantitative RT-PCR zur Bestimmung der relativen *pat* mRNA Konzentrationen etabliert. Die Berechnung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Hierbei wird zunächst der C_T -Wert (*Cycle Threshold*) der *pat* cDNA vom C_T -Wert für die *actin1* cDNA abgezogen (ΔC_T), die beiden ΔC_T -Werte der 24 °C (Kontrolle)- und

37 °C (Hitze)-Probe anschließend voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) und in die Gleichung n -fache Expression (Kontrolle zu Hitze) = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Ein Wert um 1 gibt die Stabilität der RNA unter Hitzebedingungen wider; ein Wert unter 0,5 zeigt eine Abnahme und ein Wert über 2 eine Zunahme der *pat* RNA nach Hitzestress an. Das *actin* Gen wurde hier als internes Referenzgen ausgewählt, da in einer Studie von Schmidt & Delaney (2010) gezeigt werden konnte, dass es unter Stressbedingungen eine hohe Expressionsstabilität besitzt.

C3.1 Der 5' UTR41 im *pat44*- und *pat50* Gen führt in einigen jedoch nicht allen Linien zu einer Reduktion des Pat Protein 'steady state level'

Für die Analyse, ob die 5' UTR41 des *pat43* Gens allein für hitzeinduzierte Reduktion des Pat Proteins verantwortlich ist, erstellte Sandra Kerbach im Rahmen ihrer Diplomarbeit (1999) das *pat44* Gen, welches neben der 5' UTR41 den gesamten 3' Bereich des *patOCA* Gens enthält, und brachte es in SRI Tabak ein. Aus den Transformationen ging eine Reihe von Transformanten hervor, von denen jedoch nur fünf molekularbiologisch untersucht wurden. Um statistisch stärker gesicherte Aussagen treffen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit, die aus diesen Transformationen stammenden Linien in der T₁-Generation untersucht. Zusätzlich wurde das *pat44* Gen neu in SRI Tabak transformiert, um weitere T₀-Transformanten testen zu können.

Es wurden insgesamt 40 unabhängige transgene *pat44* Linien untersucht, 19 Linien in der T₀-Generation, und 21 in der T₁-Generation. Vier der T₀-Transformanten (21 %) zeigten eine reproduzierbare Abnahme des Pat Proteins und damit der PAT Enzymaktivität nach einem 10-tägigen Hitzestress. In Abb. 22 ist exemplarisch das Pat Protein 'steady state level' von fünf unabhängigen *pat44* Events der T₀-Generation nach 10-tägigen Hitzestress im Vergleich zu der bei 24 °C behandelten Kontrolle (K) dargestellt. Parallel dazu wurden die mRNA-Gehalte mithilfe der qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse machen deutlich, dass es im Allgemeinen jedoch nicht immer eine Korrelation zwischen RNA- und Proteinkonzentrationen nach einem 10-tägigen Hitzestress gibt. Die Linien 12, 21 und 23 sind sowohl auf RNA- und Proteinebene stabil, und die Linie 22 zeigt auf beiden Ebenen eine deutliche Abnahme unter Hitzestress, Linie 18 zeigt hier jedoch keine Übereinstimmung. So ist sie zwar auf RNA-Ebene stabil, zeigt jedoch auf Proteinebene eine leichte Abnahme.

Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass eine Abnahme nicht immer so deutlich ausfiel wie in den *pat40*- bis *pat43* Pflanzen, bei der die Expression unter Hitzestress häufig bis unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots lag.

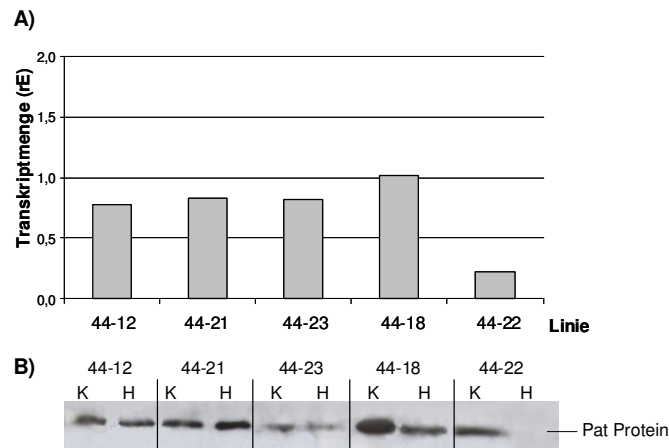


Abb. 22: Relative Pat Protein- und mRNA Gehalte für 5 *pat44* Linien unter Kontroll- und Hitzestressbedingungen in der T_0 -Generation.

A) Relativen *pat* RNA Gehalte nach Hitzestressbehandlung ermittelt mit qRT-PCR. Die Berechnung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Werte um 1 = stabil; Werte < 0,5 = Abnahme.

B) Western Blot Analyse mit spezifischen PAT-AK von 100 μ g Gesamtprotein der *pat44* Linien 12, 21, 23, 18 und 22. K, Pflanze die bei 24 °C kultiviert wurde; H, isogene Pflanze, die für 10 Tage bei 37 °C kultiviert wurde.

In der T_1 -Generation wurden zwischen Geschwistern von drei Linien unterschiedliche Reaktionen als Antwort auf Hitzestress beobachtet, was u. a. mithilfe der Enzymaktivitätstests deutlich wird (Abb. 23). So waren z. B. die Pat Konzentrationen der Geschwister der Linie 1.4 durchgehend stabil und die der Linie 4.5 zeigten stets eine Reduktion des Pat Proteins nach Hitzebehandlung. Bei der Linie 4.4 gab es sowohl Geschwister deren Pat Konzentrationen stabil waren (4 bis 8), als auch Geschwister, die eine Reduktion nach Hitzestress zeigten (1 bis 3).

Um sicherzugehen, dass die beobachteten Reduktionen nach Hitzestress tatsächlich auf die Hitzestressbehandlung zurückgeführt werden können, wurden folgende Kriterien zur Beurteilung herangezogen: Eine Hitzestressreaktion wird nur dann als Abnahme interpretiert, wenn i) T_0 -Transformanten in unabhängigen Hitzestressversuchen reproduzierbar eine Abnahme zeigten, und die Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und hitzestresserten Klon größer sind, als die Unterschiede zwischen nicht hitzestresserten Klonen, ii) bei T_1 -Transformanten mindestens sechs unterschiedliche Geschwister einer Linie eine Abnahme und keines eine stabile Expression nach Hitzestress zeigten. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden die drei Linien, die dieses unterschiedliche Verhalten zwischen den Geschwistern zeigten, nicht als inaktivierende Linien unter Hitzestress gewertet. Von den *pat44* Linien der T_1 -Generation konnten somit für 4 (19 %) eine durchgehende Reduktion nach Hitzestress in allen untersuchten Geschwistern detektiert werden.

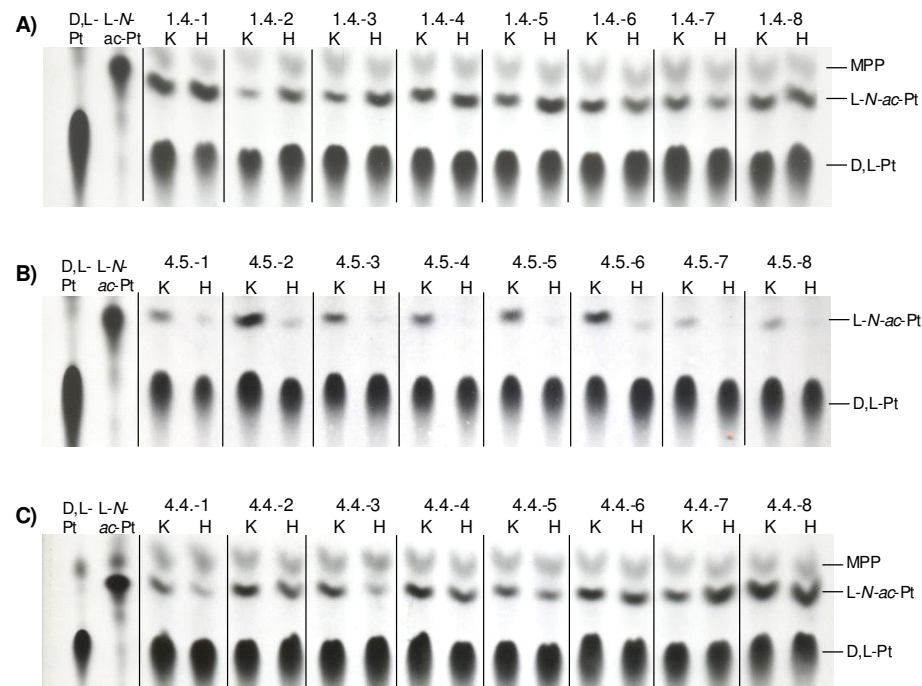


Abb. 23: Enzymaktivitätstest von jeweils 8 Geschwistern der Linien *pat44*-1.4., -4.5. und -4.4.

Analyse der Enzymaktivität in jeweils 8 verschiedenen Geschwistern der *pat44* Linien 1.4. (A), 4.5. (B) und 4.4. (C). Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. K, bei 24 °C kultivierte Kontrolle; H, für 10 d bei 37 °C inkubierte isogene Pflanze; MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure.

Neben dem *pat44* Gen wurde das *pat50* Gen, welches ebenfalls die 5' UTR41 enthält, hinsichtlich seines Verhaltens nach Hitzestress untersucht. Das *pat50* Gen enthält außerdem den *camv* Terminator sowie die verkürzte 3' UTR43. Von den 30 untersuchten *pat50* Linien der T₀-Generation zeigten insgesamt 5 (17 %) eine Reduktion des Pat Proteins nach Hitzestress (nicht dargestellt).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die 5' UTR41 nur in einigen Linien zu einer Inaktivierung des *pat* Transgens führt.

C3.2 Die 5' verlängerte 3' UTR im *pat45* Gen verursacht keine Transgeninaktivierung nach Hitzestress

Stephanie Walter konstruierte im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2001) den Pflanzentransformationsvektor pSW45-1, der das *pat45* Gen (Abb. 24A) in umgekehrter Orientierung zum *nptII* Gen enthält. Diese T-DNA wurde stabil in SRI Tabak eingebracht, um den Einfluss der 3' UTR41 auf die Expression unter Hitzestressbedingungen zu analysieren. Zusätzlich zur 3' UTR41 enthält das *pat45* Gen den 5' Bereich des *patOCA* Gens sowie dem 3' *camv*.

Walter (2001) untersuchte insgesamt 9 unabhängige Transformanten der T₀-Generation auf Proteinebene, und konnte für 8 eine Reduktion unter Hitzestress feststellen. Einige dieser

Linien in der T₁-Generation wurden hier ebenfalls untersucht. Die Analyse gestaltete sich jedoch schwierig, da die Expression bei 24 °C teilweise so gering war, dass sie nur mithilfe des Enzymaktivitätstest detektiert werden konnte. Die Pat Gehalte wurden zwar nicht mit dem Pat-ELISA quantifiziert. Dennoch lässt sich im Vergleich eine ähnlich geringe Expression wie in den *pat41* Linien feststellen (Abb. 24B).

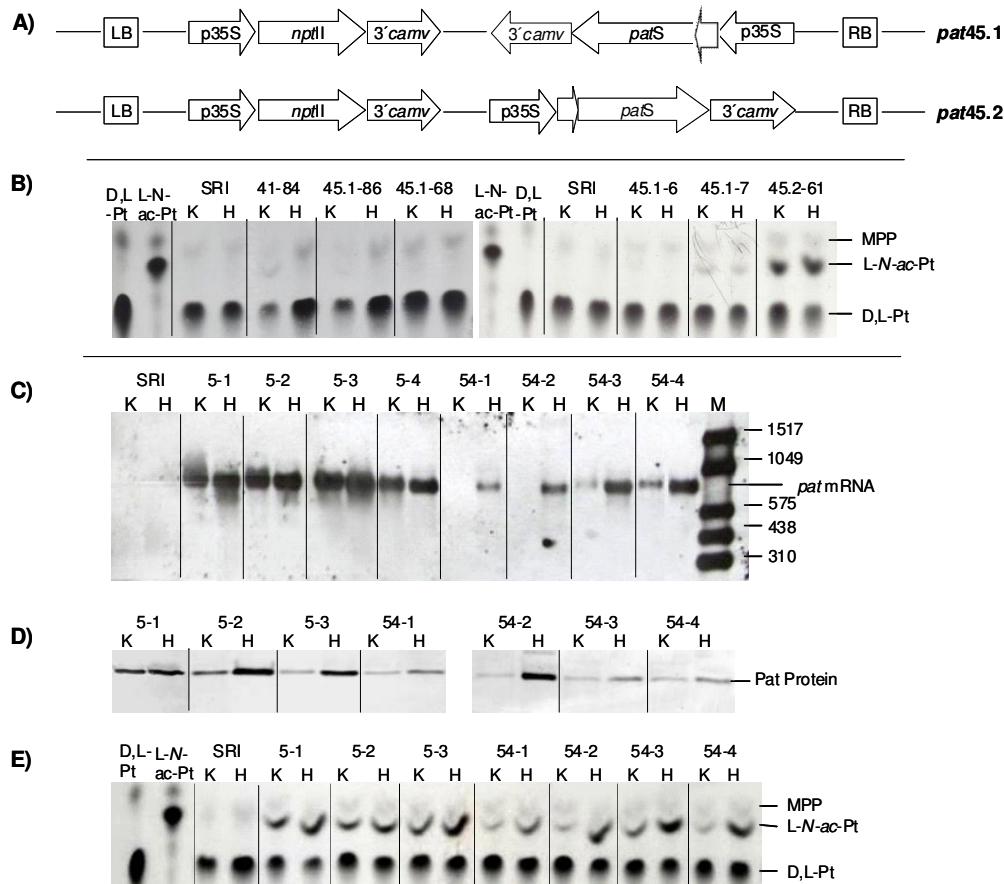


Abb. 24: Expressionsmuster verschiedener *pat45.1*- und *pat45.2* Linien.

A) T-DNA-Struktur in den *pat45.1*- und *pat45.2* Linien. B) Enzymaktivitätstest von *pat45.1* Linien 86, 68, 6 und 7 im Vergleich zur niK SRI, der *pat41* Linie 84 und der *pat45-2* Linie 61. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. C) Northern Blot von Geschwistern der *pat45.2* Linien 5 und 54. 15 µg RNA-Extrakt wurden mit Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit DIG-markierten *patS*-Sonden hybridisiert. D) Western Blot von Geschwistern der *pat45.2* Linien 5 und 54. 80 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE (15 % Polyacrylamid) aufgetrennt, auf eine ECL-Hybond-Membran übertragen und mittels ECL-Chemilumineszenz visualisiert. E) Enzymaktivitätstest von Geschwistern der *pat45.2* Linien 5 und 54. K, bei 24 °C kultivierte Kontrolle; H, für 10 d bei 37 °C inkubierte isogene Pflanze; MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure; M, RNA Molecular weight marker III (Roche)

Lediglich in der Linie *pat45.1-7* war eine etwas höhere Enzymaktivität bei 24 °C zu detektieren, und der Hitzestress führte hier zu keiner Reduktion der Enzymaktivität. In den anderen Linien war jedoch bei 37 °C Kultivierung eine Abnahme zu beobachten, was mit den Ergebnissen von Walter (2001) für die T₀-Transformanten übereinstimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den *pat45.1*- auch 11 *pat45.2* Transformanten der T₁-Generation auf ihre Expression nach Hitzestress untersucht. Die *pat45.2* Linien wurden mit einem zweiten Pflanzentransformationsvektor (pSW45-2) erzeugt. Dieser unterscheidet sich vom pSW45-1 durch die gleichgerichtete Orientierung der beiden auf der T-DNA vorkommenden Gene *nptII* und *pat45* (Abb. 24A). Keine der untersuchten Linien zeigte eine Abnahme des Pat Proteins unter Hitzestress. Im Gegensatz zeigten 9 der 11 analysierten Linien eine Zunahme des Pat Proteins, wie es auch bei den meisten *patOCA* Linien zu beobachten ist. Im Vergleich zu den *pat45.1* Linien war in den *pat45.2* Linien eine deutlich höhere Grundexpression zu detektieren. Dies wird z. B. durch die höhere Enzymaktivität der Linie *pat45.2-61* im Vergleich zu den *pat45.1* Linien deutlich (Abb. 24B). Obwohl der Pat Gehalt der Linie *pat45.2-61* mit 13,7 µg g⁻¹ TSP unter dem Mittelwert (24,6 µg g⁻¹ TSP) aller *pat45.2* Linien liegt, ist die Enzymaktivität dieser Linie um einiges höher als in der am stärksten exprimierenden *pat45.1* Linie 7.

Auch hier wurden verschiedene Geschwister innerhalb der Linien untersucht. Es konnte zwar in keinem Geschwister eine Abnahme detektiert werden. Dennoch wurden auch hier zwischen Geschwistern teilweise Unterschiede in der Expression unter Hitzestress gefunden (Abb. 24C-E). So gab es Geschwister, die unter Hitzestress stabil waren (z. B. 45.2-5-1 und 45.2-54-1) und Geschwister, die eine Zunahme zeigten (z. B. 45.2-5-3 und 45.2-54-2). Die Zunahme auf Proteinebene korrelierte mit einer Zunahme der *pat* mRNA nach Hitzestress (Abb. 24C-E). Die Ergebnisse der einzelnen Hitzestressversuche konnten keinen Einfluss der 3' UTR41 auf die hitzeinduzierte Transgeninaktivierung nachweisen. In den *pat45.1* Linien war zwar zumeist eine Abnahme der Expression bei 37 °C zu detektieren. Die Analyse der *pat45.2* Linien zeigte jedoch, dass dies unabhängig von der Präsenz der 3' UTR41 ist, sondern von der Orientierung der beiden auf der T-DNA lokalisierten Gene (*pat45*, *nptII*) abhängt.

C3.3 Der *nos* Terminator führt nur in einigen Linien zu einer Reduktion des Pat Proteins unter Hitzestressbedingungen

Als drittes destabilisierendes Element des *pat41* Gens kam schließlich noch der *nos* Terminator in Frage. Um zu untersuchen, ob dieser die hitzeinduzierte *pat* Inaktivierung auf Proteinebene verursacht, hatte Stephanie Walter das *pat46* Gen erstellt. Dieses ist mit Ausnahme des *nos* Terminators identisch mit dem *patOCA* Gen, welches stattdessen den *camv* Terminator beinhaltet. Ich habe das *pat46* Gen neu in SRI Tabak transformiert, und die resultierenden Transformanten in der T₀- und T₁-Generation analysiert.

Von den insgesamt 39 untersuchten unabhängigen Linien in der T₀-Generation konnten für 11 (28 %) eine Abnahme auf Proteinebene detektiert werden. Von einigen der analysierten Linien ist in Abb. 25A das Ergebnis des Enzymaktivitätstest dargestellt.

18 der 39 Linien wurden ebenfalls in der T₁-Generation untersucht, von denen eine eine Abnahme nach Hitzestress in allen untersuchten Geschwistern zeigte (nicht dargestellt). Viele der analysierten Linien zeigten ebenfalls wie die *patOCA*- und *pat45.2* Linien eine Zunahme des Pat Proteins unter Hitzestress (z. B. Linie 39, 41, 45 in der T₀ sowie Linie 43 und 62 in der T₁). Diese Proteinzunahme korrelierte auch hier mit einer Zunahme der *pat* RNA (Abb. 25C).

Auch hier wurde deutlich, dass sich Geschwister in ihrer Reaktion auf den Hitzestress unterscheiden können. So konnten wie bei den *pat45.2* Linien auch hier Geschwister gefunden werden, die stabil waren (z. B. Geschwister 3 der Linie 46-43 und Geschwister 2, 4, und 5 der Linie 46-62), während andere Geschwister eine Zunahme der Pat Gehalte nach Hitzestress zeigten (z. B. Geschwister 1, 2, 4 und 5 der Linie 46-43 und Geschwister 3 der Linie 46-62).

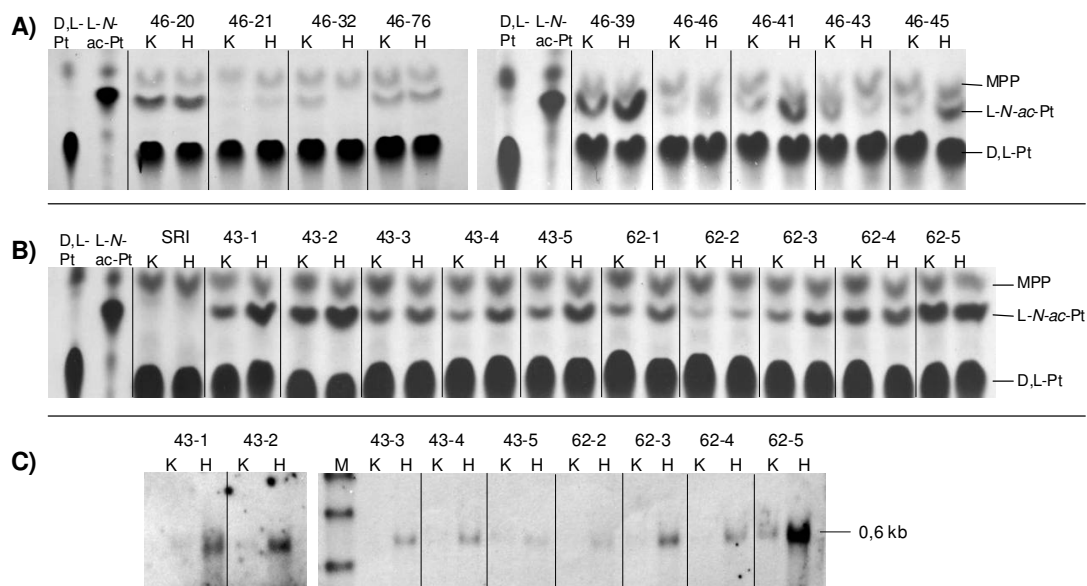


Abb. 25: Enzymaktivitätstest von einigen *pat46* Linien der T₀- und T₁-Generation, sowie Northern Blot an verschiedenen Geschwistern der Linien 43 und 62 der T₁.

A) Enzymaktivitätstest von Hitzestressversuchen an *pat46* T₀-Transformanten. B) Enzymaktivitätstest von Geschwistern der *pat46* Linien 43 und 62 in der T₁-Generation. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. C) Northern Blot von Geschwistern der *pat46* Linien 43 und 62 in der T₁-Generation. 15 µg RNA-Extrakt wurden mittels Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit DIG-markierten *patS*-Sonden hybridisiert. K, bei 24 °C kultivierte Kontrollpflanze; H, für 10 d bei 37 °C inkubierte isogene Pflanze; D,L-Pt, D,L-Phosphinothricin; L-N-ac-Pt, L-N-Acetyl-Phosphinothricin, MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure; M, RNA Molecular weight marker III (Roche)

Es konnte gezeigt werden, dass auch der *nos* Terminator nur in einigen Linien zu einer Reduktion des Pat Proteins unter Hitzestressbedingungen führt. Demnach scheint die Präsenz dieses Elementes allein ebenfalls nicht auszureichen, um die in *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Linien beobachtete, hitzeinduzierte Transgeninaktivierung zu verursachen.

Die Ergebnisse aus Hitzestressversuchen an *pat44*-, *pat50*-, *pat45.2*- und *pat46* Linien zeigen deutlich, dass keines der drei Genelemente des *pat41/pat43* Gens 5' UTR41, 3' UTR41 und *nos* Terminator allein zu einer hitzeinduzierten Transgeninaktivierung in allen Linien führt. Während 5' UTR41 und *nos* Terminator zumindest in einigen Linien eine Abnahme der *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' verursachen, konnte für den 3' UTR41 keinerlei Einfluss der zu einer Inaktivierung führt, gefunden werden.

C3.4 In der Reaktion auf Hitzestress korreliert das mRNA 'steady state level' direkt mit dem Proteingehalt

Köhne et al. (1998) konnten zeigen, dass unter Hitzestress der Verlust der Herbizidresistenz des *pat41*- und *pat40* Gens in allen getesteten Individuen von einer deutlichen Reduktion der *pat* mRNA begleitet ist. Dagegen war der hitzeinduzierte Verlust der Herbizidresistenz in den *pat43* Linien nicht die Folge reduzierter RNA Level. Sie machten für die unterschiedlichen Reaktionen die verschiedenen Kodierbereiche verantwortlich, und schlussfolgerten, dass die synthetische *patS* Kodierregion im *pat43* Gen zu einer Stabilisierung der spezifischen RNA 'steady state level' führt. In den *pat44*-, *pat50*- und *pat46* Linien, die ebenfalls den *patS* Kodierbereich enthalten und eine Abnahme auf Proteinebene zeigten, konnte ich allerdings mittels qRT-PCR auch eine Reduktion der spezifischen RNA-Level detektieren. Lediglich in einer *pat44* Linie war die Korrelation nicht gegeben. Auch Zunahmen auf Proteinebene wie ich sie für einige *pat45.2*- und *pat46* Linien beobachten konnten, korrelierten mit einer Zunahme der spezifischen RNA Level.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden einige der *pat40*- bis *pat43* Linien auf ihre RNA Gehalte nach Hitzestress mithilfe der qRT-PCR untersucht. Alle Linien dieser drei Konstrukte zeigten auch in meinen Analysen eine deutliche Abnahme des Pat Proteingehaltes nach Hitzestress. In Abb. 26 sind die qRT-PCR-Ergebnisse für jeweils 4 unabhängige Linien der Konstrukte *pat40*, *pat41* und *pat43* dargestellt. Die Berechnungen erfolgten hier ebenfalls mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Ein Wert um 1 gibt die Stabilität der RNA unter Hitzestressbedingungen wider; ein Wert unter 0,5 zeigt eine deutliche Abnahme an.

Für die Mehrzahl der *pat43* Linien konnte entgegen den Ergebnissen von Köhne (1998) eine Abnahme der RNA 'steady state level' nach Hitzestress detektiert werden. Es gab zwar auch

hier eine Linie (3f), bei der RNA- und Proteingehalte nicht übereinstimmten, jedoch konnte das auch für eine *pat40*- und *pat41* Linien beobachtet werden.

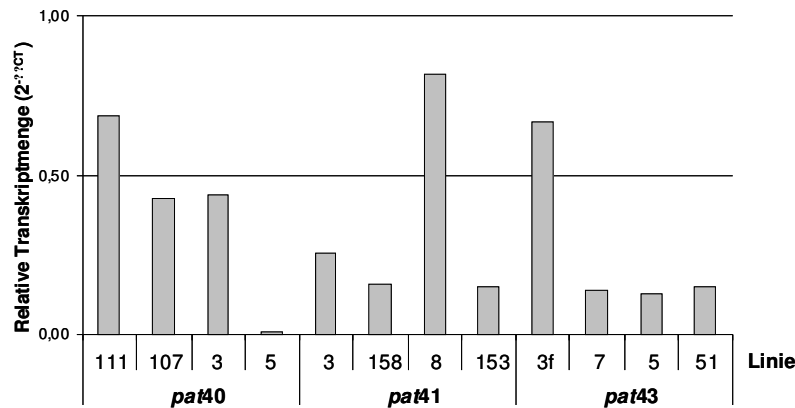


Abb. 26: Relative mRNA Gehalte unter Hitzestressbedingungen für jeweils 4 unabhängige *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Linien.

Relativen *pat* RNA Gehalte nach Hitzestressbehandlung ermittelt mit qRT-PCR. Die Berechnung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Werte um 1 = stabil; Werte < 0,5 = Abnahme.

Diese Ergebnisse lassen zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen ist die Reaktion nach Hitzestress unabhängig davon, ob der natürliche oder synthetische Kodierbereich vorhanden ist. Die synthetische *patS* Kodierregion im *pat43* Gen führt zu keiner Stabilisierung der spezifischen mRNA. Zum zweiten gibt es nach einer 10-tägigen Hitzestressbehandlung in der Regel eine Korrelation zwischen den spezifischen RNA- und Protein ‘steady state level’.

C3.5 Der Hitzestress hat keinen signifikanten Einfluss auf die *pat* mRNA Stabilität

Es konnte gezeigt werden, dass der Hitzestress in der Regel bereits das *pat* mRNA ‘steady state level’ beeinflusst. Der Hitzestress führt demnach zu einer veränderten Transkriptionsrate und/oder zu Veränderungen in der Transkriptstabilität. Die Analyse der mRNA-Halbwertszeit sollte zeigen, ob die Stabilität der mRNA durch den Hitzestress modifiziert wird. Der Versuchsaufbau ist analog zu dem in Punkt C1.9. Es wurde jedoch für jeden Erntezeitpunkt zu den zwei gegenüberliegenden Blättern ein drittes vergleichbares Blatt in Puffer mit ActD bei 37 °C inkubiert. Zur Berechnung der Halbwertszeiten während der 37 °C-Behandlung wurden die gemessenen SYBR Green Emissionswerte ebenfalls von denen der Kontrollblätter abgezogen, die in Puffer ohne ActD bei 24 °C inkubiert wurden. Als Testpflanzen diente zum einen die instabile Linie *pat50-33*, die eine starke Abnahme der *pat* mRNA unter Hitzestress zeigte. Zum anderen wurde die Linie *pat45.2-58* ausgewählt, für die im Gegensatz eine starke Zunahme der *pat* mRNA detektiert wurde (Abb. 27).

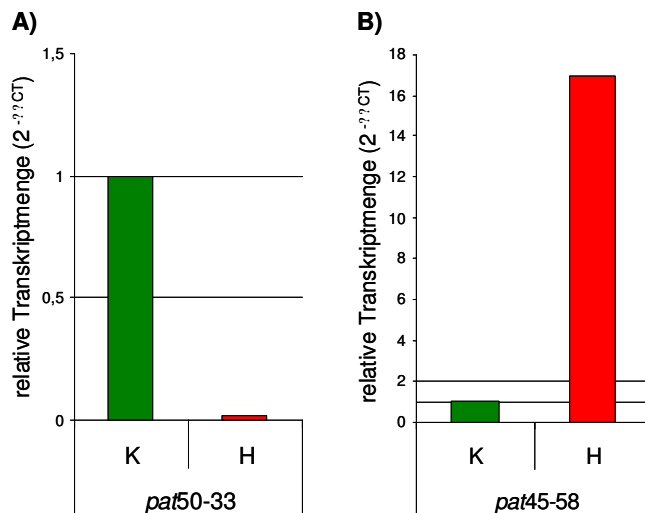


Abb. 27: Relative mRNA Gehalte unter Hitzestressbedingungen für Linie *pat50-33* und *pat45-58*.

Relativen *pat* RNA Gehalte nach Hitzestressbehandlung für *pat50-33* (A) und *pat45-58* (B) ermittelt mit qRT-PCR. Die Berechnung erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Werte um 1 = stabil; Werte < 0,5 = Abnahme; Werte > 2 = Zunahme; K, bei 24 °C inkubierte Kontrolle; H, bei 37 °C für 10 d inkubierte isogene Pflanze.

Für die instabile *pat50* Linie wurde bei 24 °C eine mRNA-Halbwertszeit von 4,2 h berechnet, unter den Hitzestressbedingungen von 37 °C betrug die Halbwertszeit 4,7 h (Abb. 28).

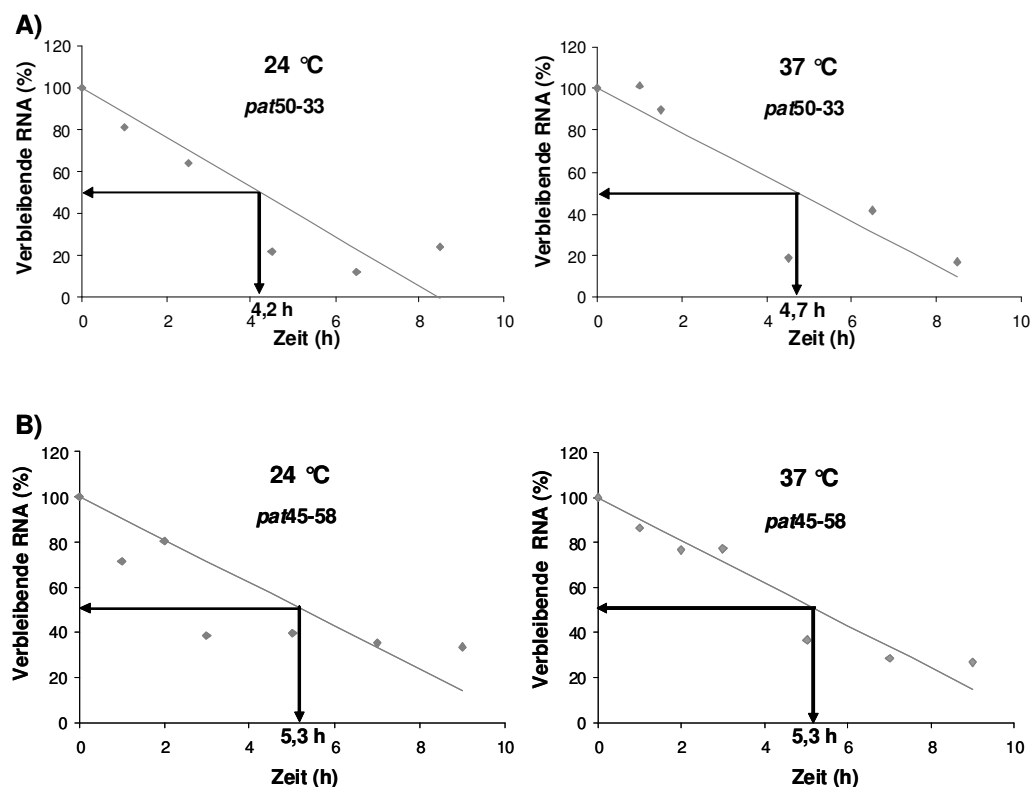


Abb. 28. mRNA Halbwertszeit unter Hitzestressbedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen für die instabile *pat50* Linie 33 und die stabile *pat45* Linie 58.

mRNA-Halbwertszeitbestimmung der Linien *pat50-33* (A) und *pat45-58* (B) unter Kontroll- sowie Hitzestressbedingungen durch Hemmung der Transkription mit ActD ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$). Analyse erfolgte mittels qRT-PCR unter Normalisierung mit der 18S rRNA. Werte der Blätter, die in ActD inkubiert wurden, wurden jeweils von denen der Kontrollblätter abgezogen. Der Prozentsatz der verbleibenden RNA ist relativ zur RNA Menge zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 0). Pfeile stellen die Zeitpunkte dar, an denen ca. 50 % der RNA Menge im Vergleich zu Zeitpunkt 0 verbleibt.

Die unter Hitzestress zunehmende *pat45* Linie zeigte keine erhöhte mRNA Stabilität, wenn die Blätter bei 37 °C inkubiert werden. Unabhängig von der Temperatur konnte hier eine Halbwertszeit von 5,3 h berechnet werden.

Die Bestimmung der mRNA-Halbwertszeiten konnten keinen Einfluss des Hitzestresses auf die Stabilität der *pat* mRNA nachweisen.

C3.6 Analyse der Beteiligung kleiner RNAs an der Inaktivierung des *pat* Transgens unter Hitzestressbedingungen

Als eine mögliche Ursache für die hitzeinduzierte Inaktivierung des *pat* Transgens kommt RNA Silencing aufgrund von kleinen, komplementären RNAs wie miRNAs oder siRNAs in Frage, die durch perfekte Basenpaarung mit der *pat* mRNA deren Abbau induzieren.

Zur Analyse der Beteiligung kleiner RNAs an der Inaktivierung des *pat* Transgens, habe ich untersucht, ob sich kleine RNAs, die eine Basenpaarung mit der *pat41* mRNA eingehen können, in hitzebehandelten Blättern finden lassen. Die Isolierung der kleinen RNAs und anschließende Northern Blot Analyse erfolgte größtenteils nach dem Protokoll von Fulneček (2007). In einem 2,5 % Agarosegel wurde jeweils überprüft, ob die Isolation der kleinen RNAs erfolgreich war (Abb. 29A).

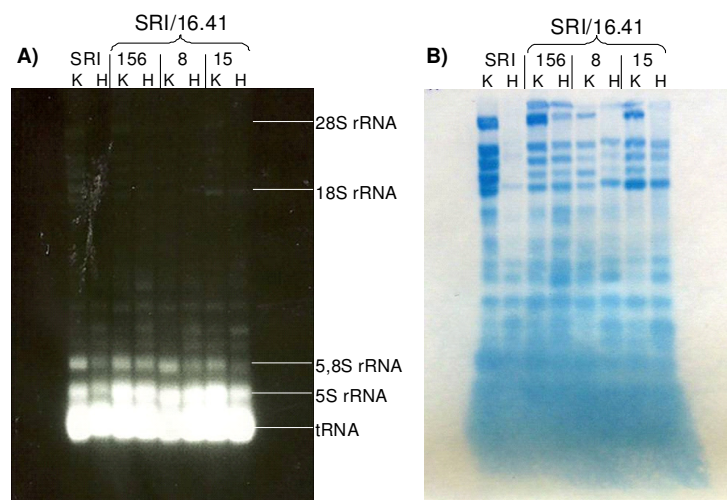


Abb. 29: Isolierung kleiner RNAs aus den Linien *pat41*-156, -8 und -15 sowie der niK SRI.

A) Auftrennung der isolierten RNA mittels Agarosegelelektrophorese (2,5 %); zwischen 60 und 90 µg RNA pro Spur wurden aufgetragen; K; bei 24 °C inkubierte Pflanze; H bei 37 °C inkubierte, isogene Pflanze; SRI; niK
B) Anfärbung der geblotteten RNA auf der Nylonmembran (Hybond N; GE Healthcare) mit Methylenblau (0,02 % in 0,3 M Natriumacetat, pH 5,5)

Die relative Anreicherung an kleineren, ribosomalen RNAs (5,8S- und 5S rRNA) und tRNAs macht deutlich, dass die Ausbeute an kleinen RNAs für weitere Analysen geeignet ist. Zum Nachweis, ob die RNA mittels Kapillarblot auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond N;

GE Healthcare) übertragen werden kann, wurde testweise die Membran nach dem Blotten mit Methylblau (0,02 % (w/v)) angefärbt (Abb. 29B). Im Größenbereich der kleineren RNAs ist das angefärbte RNA-Muster sehr diffus. Für eine bessere Auftrennung der kleinen RNAs wurde daher für anschließende Northern Blot Analysen ein 15 % Polyacrylamidgel (19:1) mit 50 % Harnstoff in 1 x TBE Puffer verwendet.

Der Nachweis erfolgte mit einer 871 bp langen DIG-markierten Sonde. Die Sonde reicht beinahe über den gesamten Bereich der *pat41* mRNA, da eine kleine regulatorische RNA überall auf der mRNA binden könnte (Abb. 30).

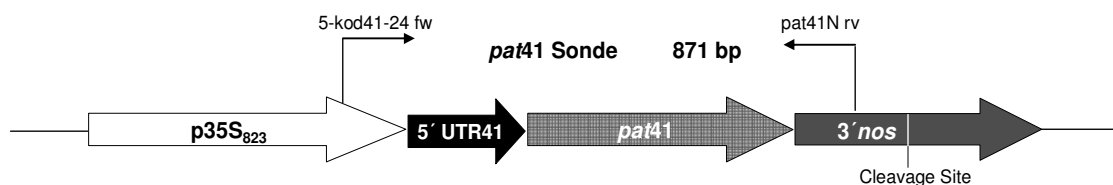


Abb. 30: Schematische Darstellung des Hybridisierungsbereichs der *pat41*-Sonde.

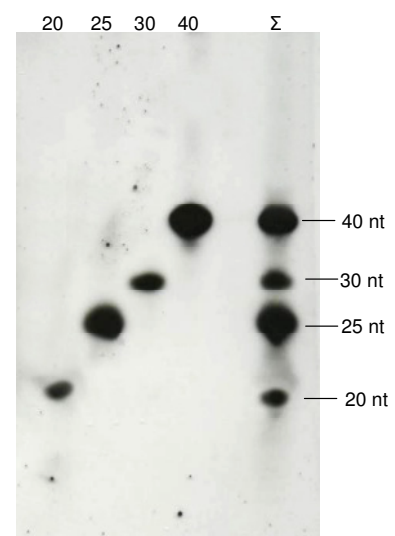
Aufgrund des hohen AT-Gehaltes des 3' nos war es jedoch nicht möglich einen reverse Primer abzuleiten, der stromabwärts der Cleavage Site bindet und zusammen mit dem 5-kod41-24 forward Primer zur erfolgreichen Herstellung einer DIG-markierten Sonde führte. Aus diesem Grund reichte die Sonde nicht über die letzten 100 bp vor der Cleavage Site des 3' nos.

Um zu testen, dass die Sonde an den verschiedenen Bereichen der mRNA gleichermaßen bindet, und um gleichzeitig einen Größenstandard zur Verfügung zu haben, habe ich vier Oligonukleotide von 20-, 25-, 30- und 40 nt Größe zu einem Marker zusammengestellt. Die synthetisierten Oligonukleotide (Invitrogen) waren komplementär zu mRNA Abschnitten, die verteilt über die *pat41* mRNA lagen.

Größe (nt)	Konzentration (nmol)
20	0,2
25	0,05
30	$1,25 \times 10^{-3}$
40	$6,25 \times 10^{-5}$

Abb. 31: Größenstandard für den Nachweis kleiner RNAs mittels Northern Blot Analyse.

Northern Blot von 4 Oligonukleotiden (Oligos) im Größenbereich von 20 bis 40 nt. Vom 20 nt Oligo wurden 0,2 nmol, vom 25 nt Oligo 0,05 nmol, vom 30 nt Oligo $1,25 \times 10^{-3}$ nmol und vom 40 nt Oligo $6,25 \times 10^{-5}$ nmol aufgetragen. In der Spur Σ wurde eine Mischung aus allen 4 Oligos zusammen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit einer 871 bp DIG-markierten *pat41* Sonde.



Um die einzelnen Oligonukleotide zu einem Größenstandard mit vergleichbaren Signalstärken kombinieren zu können, mussten die Oligonukleotide in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden, die durch Austesten bestimmt wurden (Abb. 31). Dieser Größenstandard wurde anschließend zur Markierung des Größenbereichs, in dem sich die spezifischen kleinen RNAs befinden müssten, sowie zur Überprüfung der Sonden-Hybridisierung mitgeführt.

Insgesamt vier unabhängige *pat41* Linien (156, 15, 84, 8) in 3 unabhängigen Versuchen wurden hinsichtlich der Bildung kleiner RNAs unter Hitzestressbedingungen untersucht. In Abb. 32 ist exemplarisch das Ergebnis für die Linien 156 und 84 dargestellt, die einem 10-tägigen Hitzestress (H) unterzogen wurden, im Vergleich zur ungestressten, isogenen Kontrolle (K). Die RNA der nahen isogenen Kontrolle (niK, SRI) wurde ebenfalls als Kontrolle mitgeführt. Es konnten keine spezifischen Banden im Größenbereich der kleinen RNAs bei ca. 20 bis 25 nt detektiert werden. Auch eine Verlängerung der Expositionszeit auf mehr als 2 Tage führte in keinem der Versuche zur Detektion von kleinen spezifischen RNAs. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass entweder keine spezifischen kleinen RNAs unter Hitzestress gebildet werden, oder dass die Northern Blot Analyse mit einer DIG-markierten Sonde nicht sensitiv genug ist, um die Präsenz kleiner spezifischer RNAs zu detektieren. Es ist anzunehmen, dass diese nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen.

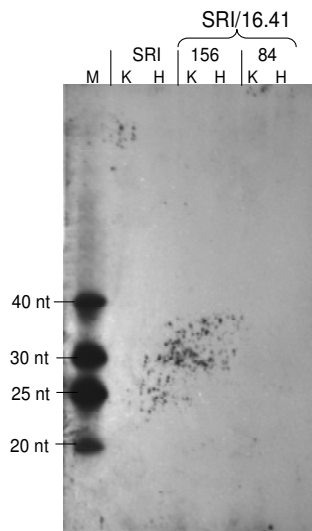


Abb. 32: Northern Blot Analyse zum Nachweis kleiner RNAs.

Northern Blot Analyse der transgenen *pat41* Linien 156 und 84 unter Hitzestress (H) und Kontrollbedingungen (K), sowie der niK (SRI). 100 µg RNA pro Spur wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (15 %) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond N) übertragen und mit einer 871 bp großen, DIG-markierten *pat41* Sonde hybridisiert. Filmexpositionszeit 4h. M, selbst entwickelter Marker, siehe Abb. 31.

C3.7 Unter Hitzestress inaktivierende *pat* Linien zeigen teilweise schon bei 24 °C eine vergleichsweise geringe Expression

Es wurde berichtet, dass die Produktion von siRNAs, die zum Silencing der Transgenexpression führen können, temperaturabhängig ist. So zeigten Szitty et al. (2003) u. a. in Tabak,

dass in dem von ihnen untersuchten Temperaturbereich von 15 °C bis 27 °C die Produktion von siRNAs und damit das Silencing zunahmen. Es ist vorstellbar, dass einige unter Hitze-stressbedingungen inaktivierende Linien bereits unter normalen Kultivierungsbedingungen einem Silencing unterliegen, welches durch eine Erhöhung der Produktion von siRNAs durch den Hitzestress verstärkt wird. Um zu ermitteln, ob dies der Fall sein könnte, wurden die Pat Proteingehalte dieser Linien mit den Mittelwerten der jeweiligen Konstrukte verglichen. In Tabelle 10 sind die Pat Proteingehalte der meisten instabilen *pat44*-, *pat46*- und *pat50* Linien dargestellt. Ein Vergleich mit den berechneten Mittelwerten der Konstrukte offenbart, dass viele der unter Hitze instabilen Linien Pat Gehalte aufwiesen, die deutlich unterhalb dieser Mittelwerte lagen (z. B. 44-11, 44-5.3, 46-43, 46-8). Es wird jedoch auch deutlich, dass einige der untersuchten Linien bei 24 °C eine durchschnittliche (44-19, 44-22, 44-3.7, 46-23, 50-33) oder sogar überdurchschnittliche (z. B. 44-18) Expression zeigten.

Tabelle 10: Pat Proteinkonzentrationen der unter Hitzestress inaktivierenden *pat* Linien.

<i>pat</i> Gen	instabile Linie	Kopien-zahl	Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mittelwert des Konstrukts
<i>pat44</i> T_0	11	1	6,10	29,2
	19	1	21,30	
	22	1	19,71	
	18	3	80,42	
<i>pat44</i> T_1	3.7	n.d.	31,44	40,3
	5.17	2	10,80	
	5.3	1	7,73	
<i>pat46</i>	32	2	16,14	41,6
	43	2	5,24	
	23	5	40,67	
	62	5	12,24	
	8	n.d.	6,64	
	9	n.d.	9,20	
<i>pat50</i>	13	2	161,82	525,2
	33	2	500,61	
	17	n.d.	86,39	

n.d. = nicht determiniert

C3.8 Die *pat* Expression unter Hitzestressbedingungen zeigt keine eindeutige Korrelation zur Kopienzahl

Köhne konnte zeigen, dass die durch moderaten Hitzestress induzierte Inaktivierung der *pat* Expression in *pat41* Linien unabhängig vom Integrationsort und von der Kopienzahl des *pat* Transgens innerhalb des Tabakgenoms ist. Dies wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. Unter den von analysierten *pat41* Linien waren Pflanzen mit 1 bis 4 Kopien des Transgens. Dennoch zeigten alle Linien eine Inaktivierung, und somit keinen Einfluss der Kopienzahl.

Köhne et al. (1998) schlussfolgerten daher, dass allein die Präsenz des 5' UTR41 und *nos* Terminator des *pat41* Gens für die hitzeinduzierte Inaktivierung verantwortlich sind.

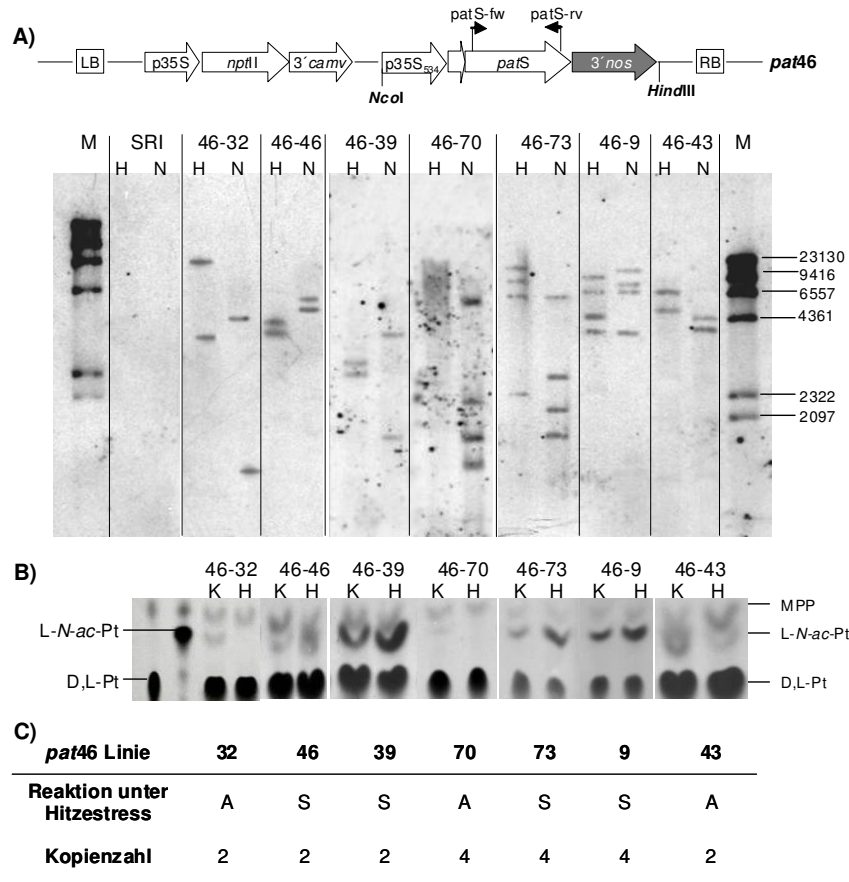


Abb. 33: Einfluss der Kopienzahl auf die *pat* Expression unter Hitzestress bei einigen *pat46* Linien.

A) Southern Blot-Analyse einiger *pat46* Linien. 25 µg DNA wurden mit *HindIII* (H) bzw. *NcoI* (N) verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt und mit DIG-markierter *patS*-Sonde detektiert.
B) Enzymaktivitätstest einiger *pat46* Linien. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. K, bei 24 °C kultivierte Kontrollpflanze; H, für 10 Tage bei 37 °C inkubierte isogene Pflanze; MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure; M, DNA Molecular weight marker II (Roche)
C) Gegenüberstellung der Kopienzahl und der Reaktion unter Hitzestress für einige *pat46* Linien. A = Abnahme; S = stabil

Unklar ist jedoch, wie in *pat* Genen, die nur eines dieser beiden Elemente enthalten, die *pat* Expression unter moderatem Hitzestress reguliert ist. Da unter Hitzestress sowohl stabile als auch inaktivierende *pat44*- (5' UTR41) und *pat46* Linien (3'*nos*) auftraten, ist vorstellbar, dass Kopienzahl- oder Integrationsorteffekte an diesen unterschiedlichen Reaktionen beteiligt sind. Der potentielle Einfluss unterschiedlicher Kopienzahlen wurde mithilfe von Southern Blot Analysen untersucht. Weder für *pat44*- noch für *pat46* Linien konnte eine eindeutige Abhängigkeit zwischen Kopienzahl und Reaktion auf moderaten Hitzestress festgestellt werden. In Abb. 33 sind exemplarisch die Ergebnisse aus Southern Blot Analysen einiger *pat46* Linien und deren Reaktion auf Hitzestress mittels Enzymaktivitätstests dargestellt. Hier wird deutlich, dass Linien mit 2 oder 4 *pat* Kopien sowohl einen stabilen als auch einen

abnehmenden Proteingehalt nach moderatem Hitzestress aufwiesen. Zudem befanden sich unter den inaktivierenden *pat44* Linien auch 3 Linien, die nur eine Kopie aufwiesen. Somit scheint die hitzeinduzierte Transgeninaktivierung nicht zwingend abhängig vom Vorliegen homologer Regionen zu sein.

In der T₁-Generation traten zwischen Geschwistern einiger *pat44* Linien eine unterschiedliche Transgenexpression nach Hitzestressbehandlung auf. Den Gesetzen der Vererbung folgend, kann es vorkommen, dass sich die Geschwister in ihren Kopienzahlen unterscheiden. Daher wurden Geschwister, die sich in ihrer Reaktion auf Hitzestress unterschieden, auf ihre Kopienzahl untersucht. Exemplarisch sind in Abb. 34 drei Geschwister der Linie 5.89 dargestellt. Alle drei enthalten jeweils 2 Kopien mit identischem Integrationsort. Während Geschwister 2 und 3 stabil sind, zeigte Geschwister 4 eine Abnahme des Pat Proteins nach Hitzestressbehandlung. Auch für die Geschwister der anderen zwei Linien, die sich in der Transgenexpression unter Hitzestress unterschieden, konnte keine Korrelation zur Kopienzahl ermittelt werden (siehe Anhang F4). Im Gegensatz dazu konnten z. T. variierende Kopienzahlen gefunden werden zwischen Geschwistern, die sich in ihrer *pat* Expression nach Hitzestress nicht unterschieden.

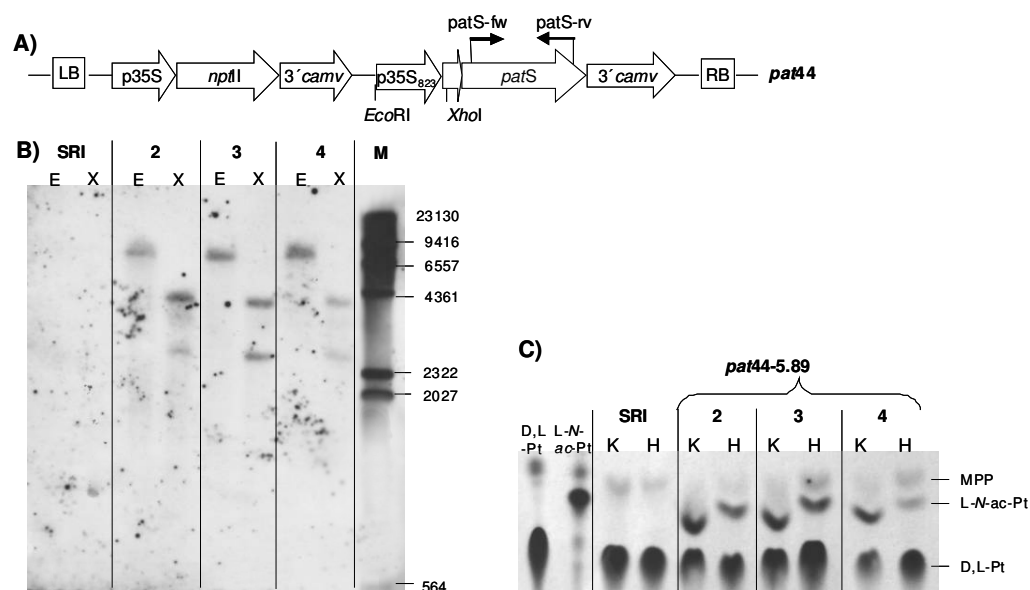


Abb. 34: Einfluss der Kopienzahl auf die *pat* Expression bei 37 °C zwischen Geschwistern der *pat44* Linie 5.89.

A) Restriktionsschnittstellen und Sondenbindung für das *pat44* Gen. B) Southern Blot-Analyse von Geschwistern der *pat44* Linie 5.89. 25 µg DNA wurden mit *EcoRI* (E) bzw. *XhoI* (X) verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt und mit DIG-markierter *patS*-Sonde detektiert. C) Enzymaktivitätstest; Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. K, bei 24 °C kultivierte Kontrollpflanze; H, für 10 Tage bei 37 °C inkubierte isogene Pflanze; MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure; M, DNA Molecular weight marker II (Roche)

Es konnte demnach keine eindeutige Korrelation zwischen Kopienzahl und der Expression unter Hitzestress nachgewiesen werden.

C4 Einfluss *cis*-regulatorischer Sequenzen auf das *pat*-mRNA- und Protein ‘steady state level’ unter Hitzestressbedingungen in Kartoffel

Um herauszufinden, ob die in Tabak beobachtete hitzeinduzierte Inaktivierung des *pat* Transgens auch in anderen Kulturarten zu finden ist, wurde dieser Mechanismus zusätzlich in Kartoffel untersucht. Sämtliche transgenen Kartoffel Events der Sorte Albatros wurden hinsichtlich der *pat* Expression nach 10-tägiger Kultivierung bei 37 °C analysiert.

C4.1 Die einzelnen Genelemente haben in Kartoffel einen vergleichbaren Einfluss auf die Expression des *pat* Transgens unter Hitzestress

Wie in Tabak ist auch bei dem *pat*OCA Kartoffel Event nach 10-tägigen Hitzestress eine Zunahme der RNA- und Protein ‘steady state level’ zu beobachten (Abb. 35).

Dagegen führt in den Events, die das *pat*40-, *pat*41- und *pat*43 Gen enthalten, der Hitzestress zu einer Inaktivierung der *pat* Expression in allen untersuchten Events, von denen häufig weder Pat Protein noch Enzymaktivität im hitzebehandelten Klon nachweisbar war.

Wie in Tabak hat auch in Kartoffel der 5′ Bereich der 3′ UTR wenig Einfluss auf die Hitzestabilität. So zeigte keines der 12 unabhängigen *pat*45 Events, deren *pat*45 Gen mit Ausnahme der 3′ UTR (3′ UTR41) identisch mit dem *pat*OCA Gen ist (3′ UTRS), eine Abnahme. Es konnte im Gegensatz wie bei *pat*OCA sogar überwiegend eine Zunahme des *pat* mRNA- und Protein ‘steady state level’ detektiert werden.

Das *pat*44 Gen ermöglicht die Analyse, ob, neben der Kombination aus 5′ UTR41 und *nos* Terminator, die 5′ UTR41 allein in der Lage ist einen Verlust der Herbizidresistenz in Kartoffel herbeizuführen. Von den sechs untersuchten unabhängigen *pat*44 Events zeigten fünf (83 %) eine Abnahme der *pat* mRNA- und Protein ‘steady state level’ nach Hitzestress. Dies entspricht einem höheren Anteil instabiler Events als in Tabak (21 %), die Stichprobenanzahl ist jedoch auch deutlich geringer.

Der Hitzestress von 37 °C hat in Kartoffel einen mit in Tabak vergleichbaren Einfluss auf die Transgenexpression.

C4.2 In der Reaktion auf Hitzestress korreliert auch in Kartoffel das *pat* mRNA-direkt mit dem Protein ‘steady state level’

Wie in Tabak gibt es auch in Kartoffel eine Korrelation zwischen *pat* mRNA- und Protein ‘steady state level’ (Abb. 35). So sind Proteinzunahmen nach Hitzestress von einer Zunahme der mRNA Gehalte begleitet. Abnahmen auf Proteinebene zeigen auch stets eine Abnahme auf RNA-Ebene (Daten im Anhang F5).

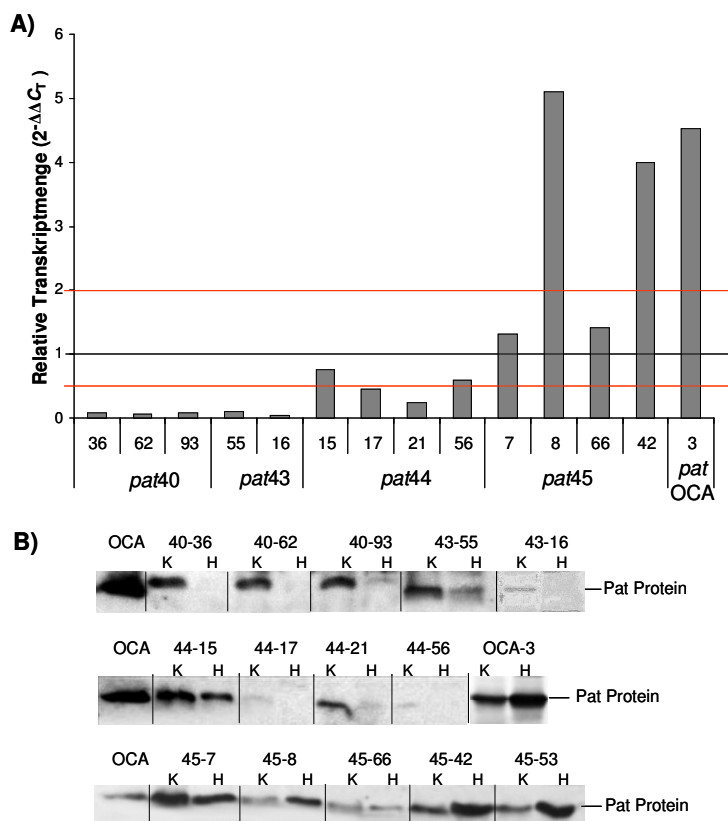


Abb. 35: Relative mRNA- und Protein ‘steady state level’ für einige *pat* Events unter Hitzestress.

A) qRT-PCR-Ergebnisse der relativen *pat* RNA Gehalte nach 10-tägiger 37 °C-Behandlung. Die Berechnung erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

Werte um 1 = stabil; Werte < 0,5 = Abnahme; Werte > 2 = Zunahme.

B) Western Hybridisierung mit spezifischen PAT-AK von 100 µg Gesamtprotein verschiedener *pat* Events. K, Pflanze die bei 24 °C kultiviert wurde; H, isogene Pflanze, die für 10 Tage bei 37 °C kultiviert wurde.

Die Expression bei 37 °C wird demzufolge bereits auf Ebene des *pat* Transkripts reguliert.

C4.2 Der Hitzestress hat Einfluss auf die Länge der *pat40*-Transkripte

Die Bestimmung der Cleavage Sites (CS) der verschiedenen Transkriptionsterminatoren, die in den verschiedenen *pat* Tabaklinien verwendet werden, zeigte für die *pat40*- bis *pat43* Linien ein häufiges ‘read-through’ des 3′*nos*. Um zu ermitteln, ob der Hitzestress einen Einfluss auf die Verwendung der CS und damit auf die Länge der *pat* Transkripte hat, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Auf einen Nachweis mittels RT-PCR wurde verzichtet, da diese nur die Identifizierung polyadenylierter Transkripte ermöglicht. Aufgrund der geringen Expression der *pat40*- und *pat41* Linien ist es mir nicht gelungen verwertbare Ergebnisse zu erzielen. Stephanie Walter konnte jedoch für *pat40* Kartoffelevents zeigen, dass der Hitzestress die Transkriptlängen beeinflusst (unveröffentlichtes Ergebnis, Abb. 36).

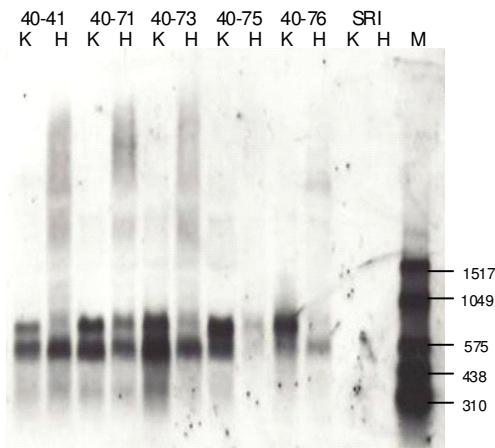


Abb. 36: Einfluss des Hitzestresses auf die *pat40*-Transkriptlängen verschiedener Kartoffelevents.

Northern Blot von verschiedenen *pat40* Kartoffelevents. 15 µg RNA-Extrakt mittels Agarosegelelektrophorese (1 %) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit DIG-markierter *pat41*-Sonde hybridisiert. K, bei 24 °C kultivierte Kontrollpflanze; H, für 10 Tage bei 37 °C inkubierte isogene Pflanze; M, RNA Molecular weight marker III (Roche)

In den ungestressten Kontrollpflanzen (K) tritt ein ca. 900 bp großes Fragment auf, das vermutlich *pat40* Transkripten unter Verwendung der Major CS inklusive eines ca. 180 bp langen Poly(A)-Schwanzes entspricht. Daneben gibt es ebenfalls ca. 600- und 350 bp große Fragmente, die vermutlich Abbauprodukte der *pat40* mRNA darstellen. An dieser Stelle ist nicht auszumachen, ob der Abbau vom 5'- oder vom 3'-Ende ausgeht. Das 600 bp große Fragment würde jedoch z. B. der Größe eines *pat40* Transkripts ohne 3'nos und Poly(A)-Schwanz entsprechen. Zusätzlich treten in einigen Kontrollpflanzen (40-73, -75, -76) auch größere Fragmente auf, die auf 'read-through' des 3'nos schließen lassen, und die Ergebnisse der RT-PCR in Tabak bestätigen. In den hitzestressierten Klonen dieser Events nimmt der Anteil an 'read-through'-Transkripten zu, wohingegen es zu einer deutlichen Reduktion des ca. 900 bp großen Fragments kommt. Der Hitzestress scheint somit zu einer Verstärkung des 'read-through' des 3'nos und damit zu unterschiedlich langen *pat40* Transkripten zu führen.

C4.3 In Kartoffel gibt es ebenfalls keinen eindeutigen Einfluss der Kopienzahl auf die Reaktion auf moderatem Hitzestress

In Kartoffel konnte ebenfalls kein eindeutiger Einfluss der Kopienzahl auf die Transgenexpression unter moderatem Hitzestress festgestellt werden. Das *pat46* Gen wurde nicht in Albatros eingebracht, sodass lediglich unter den *pat44* Events (5' UTR41) variierende Reaktionen nach Hitzestressbehandlung beobachtet werden konnten. Für die einzige stabile Linie (15) konnte ebenso wie für zwei instabile Linien (17 und 21) jeweils nur eine *pat* Kopie nachgewiesen werden (siehe Abb. 21). Somit ließ sich auch bei Kartoffel kein eindeutig positiver oder negativer Einfluss der Kopienzahl auf Stabilität der Expression nach Hitzestress zeigen.

C5 Untersuchungen zur systemischen Ausbreitung des hitzeinduzierten Inaktivierungszustandes in Tabak

Sandra Kerbach konnte im Rahmen ihrer Diplomarbeit zeigen, dass die 37 °C-Behandlung eines Blattes einer transgenen *pat41*- bzw. *pat43* Tabakpflanze ausgehend von diesem Blatt ebenfalls zu einer Reduktion im Protein ‘steady state level’ in unbehandelten Blättern führte. Laut Köhne et al. (1998) sollte in *pat41* Pflanzen eine Inaktivierung bereits auf RNA-Ebene stattfinden, während das RNA ‘steady state level’ in *pat43* Pflanzen vom Hitzestress unbeeinflusst bleibt. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass es für eine hitzeinduzierte *pat* Inaktivierung zwei verschiedene Auslösungsmechanismen geben muss (Köhne et al., 1998; Kerbach, 1999).

Da diese Schlussfolgerungen auf der Untersuchung nur weniger Pflanzenbasieren, wurden zur Verifizierung der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit weitere *pat41*- und *pat43* Tabakpflanzen hinsichtlich der systemischen Ausbreitung der hitzeinduzierten *pat*-Inaktivierung untersucht. Zusätzlich sollten die Signale, die zur Bildung und Vermittlung des Inaktivierungsstatus innerhalb der Pflanze führen, identifiziert und charakterisiert, und die Wege auf denen das Signal innerhalb der Pflanze transportiert werden, aufgezeigt werden. Im Versuchsaufbau habe ich mich zunächst auf die Erfahrungen aus der Diplomarbeit von Sandra Kerbach gestützt (Abb. 37).

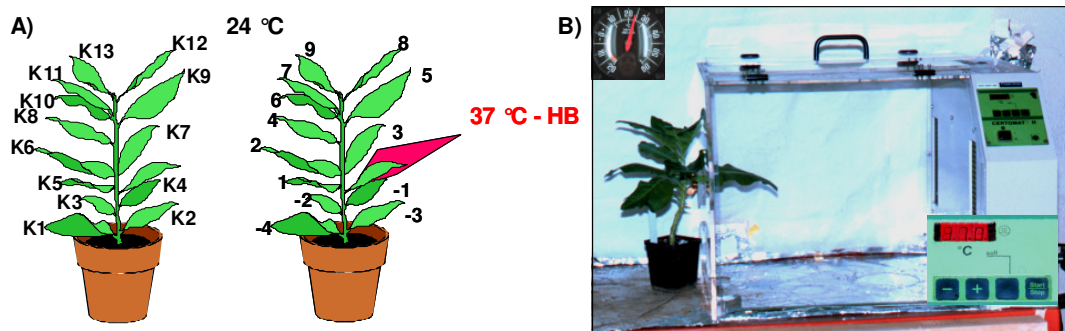


Abb. 37: Überblick des Testsystems zur Untersuchung der systemischen Ausbreitung des durch Hitzebehandlung ausgelösten Inaktivierungssignals in transgenen *pat41*- und *pat43* Tabakpflanzen.

A) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Das Blatt der Pflanze, welches in die 37 °C-Kammer konstanter Temperatur ragt, wurde rot unterlegt. Die Nummerierung der Blätter erfolgte nach dem demonstrierten Verfahren: das hitzebehandelte Blatt wurde in dieser Arbeit mit ‘HB’ bezeichnet, darüber wachsende Blätter in aufsteigender Reihenfolge mit positiven Zahlen und darunter befindliche mit negativem Vorzeichen in absteigender Reihenfolge. Blätter der isogenen ungestressten Kontrolle erhielten ein ‘K’ als Vorzeichen und wurden von unten nach oben durchnummeriert

B) Photographische Aufnahme der 37 °C-Pflanzenkammer mit Testpflanze (Kerbach, 1999). Ein Blatt der Pflanze ragt in die Kammer, außerhalb wuchs die Pflanze bei 24 °C.

Zur Berücksichtigung des Einflusses unterschiedlicher physiologischer Zustände aufgrund des Entwicklungszustandes der verschiedenen Blätter wurden parallel zur Pflanze, die an einem

Blatt hitzebehandelt wurde, alle Blätter einer isogenen Kontrollpflanze analysiert, die vollständig bei 24 °C kultiviert wurde. In der Arbeit von S. Kerbach (1999) diente jeweils nur ein Blatt einer unbehandelten isogenen Pflanze als Kontrolle. Zum besseren Verständnis wird die Pflanze, die an einem Blatt einem Hitzestress von 37 °C ausgesetzt wurde, nachfolgend als Signaltransferpflanze bezeichnet.

C5.1 Es gibt keine systemische Ausbreitung der Hitzestress-induzierten Transgeninaktivierung in *pat41* Linien

Dreizehn verschiedene *pat41*-Pflanzen der Linien 156, 153, 84,3, 8 und 15 wurden hinsichtlich der Vermittlung der Transgeninaktivierung innerhalb der Pflanze untersucht.

Aufgrund der geringen Grundexpression der *pat41*-Pflanzen, sowie unspezifischer Signale im Größenbereich des Pat-Proteins im Western Blot, die eine Identifizierung der spezifischen Pat-Proteinbanden erschwerten, war die alleinige Auswertung des Western Blots für die Analyse nicht ausreichend. Der Nachweis der Pat-Enzymaktivität bietet dagegen den Vorteil fehlender Nebensignale, und durch Verlängerung der Expositionszeit werden auch Signale von Pflanzen mit schwacher Expression detektierbar. Zudem wurde der Test standardisiert, indem gleiche Mengen an TSP eingesetzt wurden. Die Ergebnisse von Stanzproben der Blätter dreier isogener *pat41*-Pflanzen der Linie 156 zeigen, dass bezogen auf das Frischgewicht eine Zunahme an TSP in Richtung der jüngeren Blätter erfolgt (Abb. 38). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass eine Zunahme an Pat mit zunehmendem Abstand vom hitzebehandelten Blatt auf eine Zunahme des TSP in den jüngeren Blättern zurückzuführen ist, wurde in die Enzymreaktion für jedes Blatt der analysierten Pflanze die gleiche Menge an TSP eingesetzt.

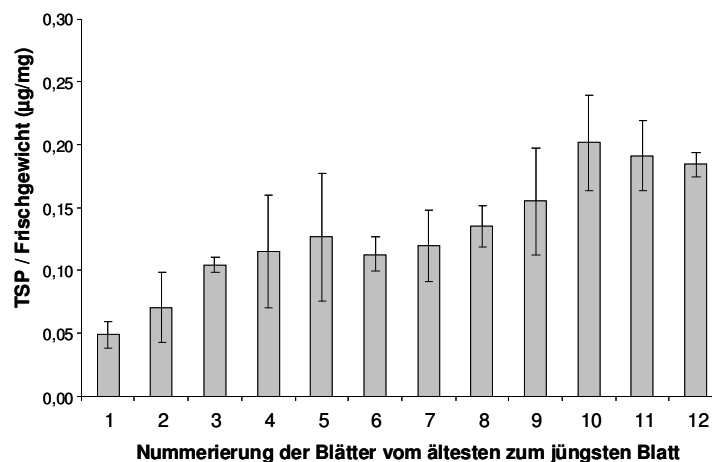


Abb. 38: Abhängigkeit des TSP vom Entwicklungsstand des Blattes (Mittlung aus 3 isogenen Pflanzen der Linie 156)

Durchschnittliches lösliches Gesamtprotein (TSP) pro Frischgewicht in $\mu\text{g mg}^{-1}$ für alle Blätter von drei isogenen *pat41*-156-Pflanzen. Bestimmung des TSP erfolgte mit dem Bradford-Assay.

Der Vergleich mit den Ergebnissen des quantifizierenden Pat-ELISA für die Linie 156 (Geschwister 1) ergab eine hohe Übereinstimmung (Abb. 39), sodass für die weitere Analyse von *pat41* Pflanzen auf den kostenintensiven Pat-ELISA verzichtet werden konnte. Während die Pat-Proteingehalte in den verschiedenen Blättern der ungestressten Kontrollpflanze relativ homogen sind, ist bei den Blättern der isogenen Signaltransferpflanze, ein Schwanken in den Pat-Konzentrationen der verschiedenen Blätter festzustellen, die jedoch nicht mit der Entfernung vom hitzestressierten Blatt korreliert. So ist keine stetige Zunahme des Pat Proteins mit zunehmendem Abstand vom 37 °C-behandelten Blatt zu detektieren. Im zweiten Blatt oberhalb des hitzestressierten Blattes konnte zwar der geringste spezifische Proteingehalt gemessen werden, ein Blatt darüber war er jedoch höher als in allen darauffolgenden Blättern. Insgesamt erscheint die Expression in der Signaltransferpflanze leicht reduziert im Vergleich zur isogenen Kontrollpflanze.

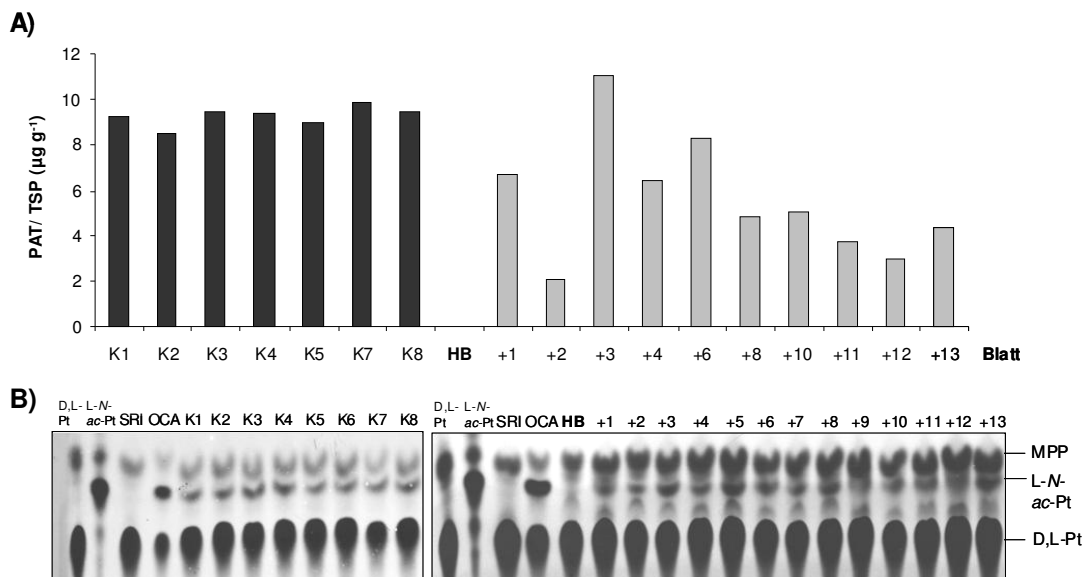


Abb. 39: Pat-ELISA (A) und Enzymaktivitätstest (B) der Pflanze *pat41-156-1*.

A) Protein 'steady state level' in den Blättern einer *pat41-156-1* Kontroll- und einer isogenen Signaltransferpflanze. B) Pat-Enzymaktivität derselben Pflanzen. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. K1 bis K8, Blätter 1 bis 8 der ungestressten Kontrollpflanze; HB, hitzebehandeltes Blatt; +1 bis +13, Blätter 1 bis 13 der Signaltransferpflanze; OCA, Blatt der *patOCA-58*-Pflanze, bei 24 °C kultiviert; SRI, Blatt einer nIK, bei 24 °C kultiviert; D,L-Pt, D,L-Phosphinothricin; L-N-ac-Pt, L-N-Acetyl-Phosphinothricin, MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure.

In Abb. 40 ist das Ergebnis des optimierten Enzymaktivitätstest für einen weiteren Versuch zum Signaltransfer an der Pflanze *pat41-84-1* dargestellt. Sowohl in der Kontroll- als auch in der Signaltransferpflanze ist in den unteren 3 Blättern, bezogen auf das TSP, weniger Pat Enzymaktivität vorhanden als in den darüberliegenden Blättern. Dies ähnelt den Ergebnissen von S. Kerbach (1999), jedoch konnte die Zunahme an Pat-Aktivität in den oberen Blättern auch für die ungestresste Kontrollpflanze beobachtet werden.

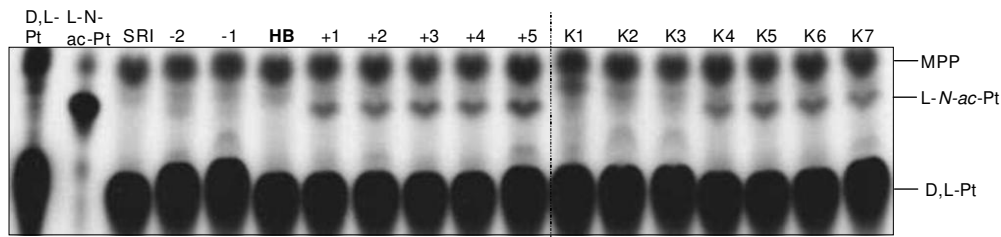


Abb. 40: Enzymaktivitätstest der Signaltransfer- und isogenen Kontrollpflanze *pat41-84-1*.

Analyse der Pat-Enzymaktivität in den verschiedenen Blättern der *pat41* Pflanze 84-1, von der das HB-Blatt bei 37 °C inkubiert wurde, im Vergleich zu einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. K1 bis K7, Blätter 1 bis 7 der ungestressten Kontrollpflanzen; HB, hitzebehandeltes Blatt; -2bis +5, Blätter -2 bis +5der-Signaltransferpflanze; SRI, Blatt einer niK, bei 24 °C kultiviert; L-N-ac-Pt, L-N-Acetyl-Phosphinothricin; MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure.

Die Analysen auf RNA-Ebene erfolgten mittels Northern Blot, da die quantitative real-time RT-PCR zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert war. Es war mir jedoch nicht möglich auswertbare Ergebnisse zu produzieren. Das lag zum einem an der zu geringen Menge an Gesamt-RNA, die insbesondere aus den älteren Blättern isoliert werden konnten, sodass die Menge der spezifischen *pat* mRNA unterhalb der Nachweisgrenze der Northern Blot Analyse lag. Zum anderen war die Qualität häufig zu schlecht um eine Auswertung zu ermöglichen. Obwohl im späteren Verlauf dieser Arbeit die qRT-PCR zur Quantifizierung der *pat* mRNA Gehalte etabliert wurde, wurde aufgrund der erzielten Ergebnisse auf Protein- und Aktivitätsebene auf weitere RNA-Analysen verzichtet.

Neben den Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene, wurden sämtliche Pflanzen ebenfalls phänotypisch auf einen hitzeinduzierten Verlust der Herbizidresistenz untersucht. Dazu wurden nach 3 Tagen Hitzebehandlung jeweils 5 µl einer Phosphinothricin (Pt)-Lösung (10 mg ml⁻¹) aufgetropft, und auftretende Nekrosen nach Ablauf der Hitzebehandlung fotografisch dokumentiert. Auf eine Applikation von Pt am hitzebehandelten Blatt wurde verzichtet, da es hier zur Bildung sehr starker Nekrosen kam, die in Kombination mit der Hitzestressbehandlung häufig zum Absterben des gesamten Blattes führte.

In Abb. 41 ist exemplarisch das Ergebnis der Pt-Behandlung für die Pflanze *pat41-84-1*, und die isogene Kontrollpflanze dargestellt. Bei beiden Pflanzen lassen sich an den unteren 4 bis 5 Blättern deutliche kreisförmige Nekrosen (rot eingekreist) infolge der Pt-Applikation feststellen. Der Durchmesser der nekrotischen Veränderungen auf den Blättern nahm in Richtung der jüngeren Blätter ab. Auf den jüngsten drei Blättern kam es zu keiner Nekrosenbildung, was anzeigt, dass hier an den Applikationsstellen ausreichend Pat Enzym vorhanden war, um das phytotoxische L-Pt in das nicht toxische L-N-ac-Pt umzusetzen. Da diese Ergebnisse für beide Pflanzen gleichermaßen auftraten, kann man keine Abhängigkeit

der Nekrosenbildung von der systemischen Vermittlung des Inaktivierungsstatus infolge der Hitzestressbehandlung eines Blattes ableiten.

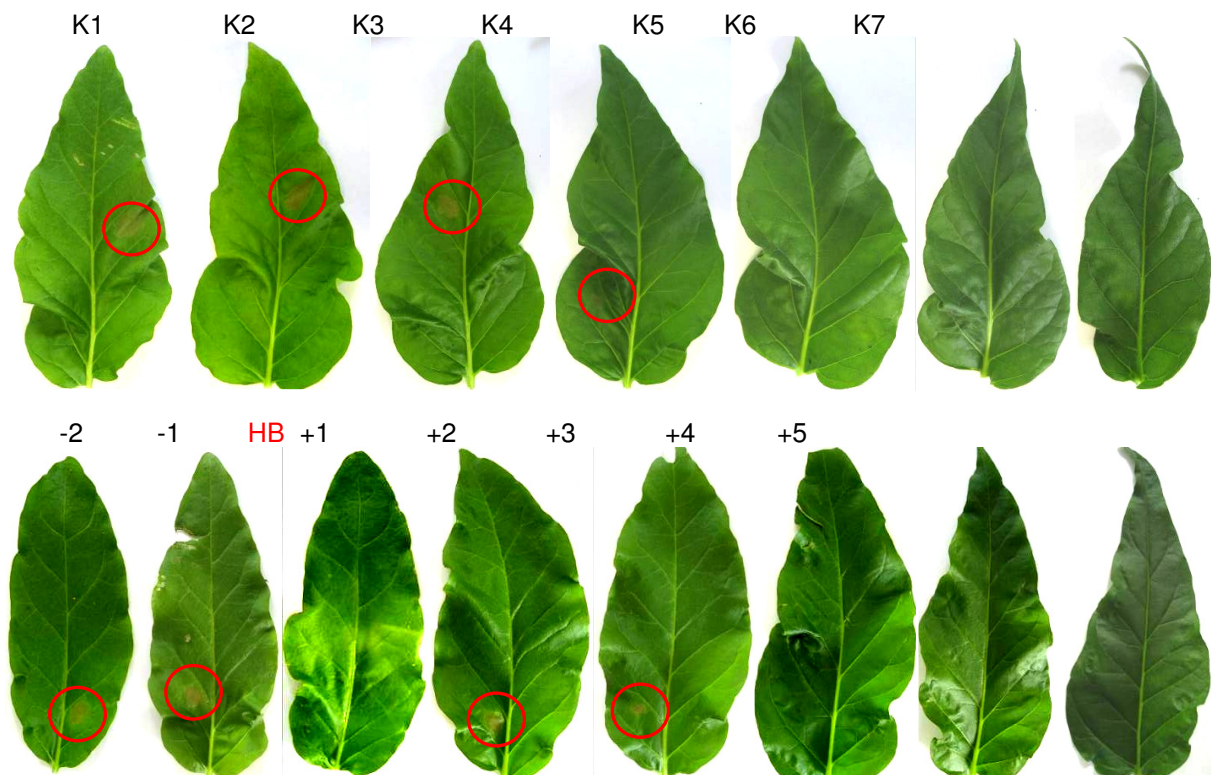


Abb. 41: Phänotypischer Test zur Pt-Resistenz nach Pt-Tropfapplikation auf Blättern der Tabakpflanze *pat41-84-1* nach 7-tägiger Hitzebehandlung eines Blattes, und auf Blättern einer ungestressten, isogenen Kontrollpflanze.

Jeweils 5 μl einer Pt-Lösung (10 mg ml^{-1}) wurden am 3. Tag der Hitzebehandlung auf alle Blätter mit Ausnahme des hitzebehandelten Blattes (HB) appliziert. Die Nummerierung erfolgte nach dem Schema aus Abb. 37.

Die phänotypischen Beobachtungen an der Pflanze *pat41-84-1* konnten durch Beobachtungen an den anderen untersuchten Pflanzen bestätigt werden. Das Auftreten von nekrotischen Veränderungen an den Pt-Applikationsstellen war zwischen Signaltransferpflanze und isogener Kontrollpflanze stets vergleichbar. In keinem Fall war die Bildung von Nekrosen an den Applikationsstellen bei der Signaltransferpflanze augenfällig verstärkt und auf merklich mehr Blättern feststellbar als bei der isogenen Kontrollpflanze. In stärker exprimierenden Pflanzen z. B. der Linien 156, 8 und 3 war die Bildung von Nekrosen häufig auf die untersten 1 bis 2 Blätter beschränkt (nicht dargestellt).

Weder phänotypisch noch molekularbiologisch konnte die systemische Vermittlung einer temperaturinduzierten Reduktion der Pat Enzymaktivität von einem hitzebehandelten Blatt in ungestresste Pflanzenteile beobachtet werden. Reduktionen in den unteren, benachbarten Blättern des 37°C -behandelten Blattes waren auch stets in den unteren Blättern der ungestressten isogenen Kontrollpflanze zu beobachten.

C5.2 Es gibt keine systemische Ausbreitung der Hitzestress-induzierten Transgeninaktivierung in *pat43* Linien

Köhne et al. (1998) sahen die Ursache für die Sensitivität in *pat43* Linien nach einer Hitzebehandlung in einer drastischen Reduktion des Pat Proteins, während das 'steady state level' der *patm*RNA im Gegensatz zu den *pat41* Pflanzen unbeeinflusst bleibt. Erst im Verlauf dieser Arbeit konnte ich an mehreren unabhängigen Linien (siehe C3.4) zeigen, dass der Hitzestress auch bei *pat43* Pflanzen bereits das RNA 'steady state level' beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit ließen vermuten, dass die Regulation unabhängig vom Kodierbereich in *pat41*- und *pat43*-Pflanzen gleich ist. Die Versuche zum Signaltransfer erfolgten jedoch zu Beginn dieser Arbeit, sodass gemeinsam mit Henrik Nausch im Rahmen seiner von mir betreuten Diplomarbeit (2007) auch sieben *pat43* Pflanzen der Linien 7, 17, und 51 hinsichtlich der systemischen Vermittlung der *pat* Inaktivierung nach Hitzestressbehandlung untersucht wurden.

In ungestressten Blättern konnte phänotypisch kein Verlust der Pt-Resistenz detektiert werden, im Gegensatz zum HB-Blatt, dass ebenfalls wie bei *pat41*-Pflanzen seine Resistenz gegenüber Pt verlor (nicht dargestellt). Molekularbiologisch wurde in keinem der durchgeführten Experimente eine Reduktion auf Proteinebene aufgrund einer Vermittlung in nicht gestresste Blätter der gleichen Pflanze beobachtet.

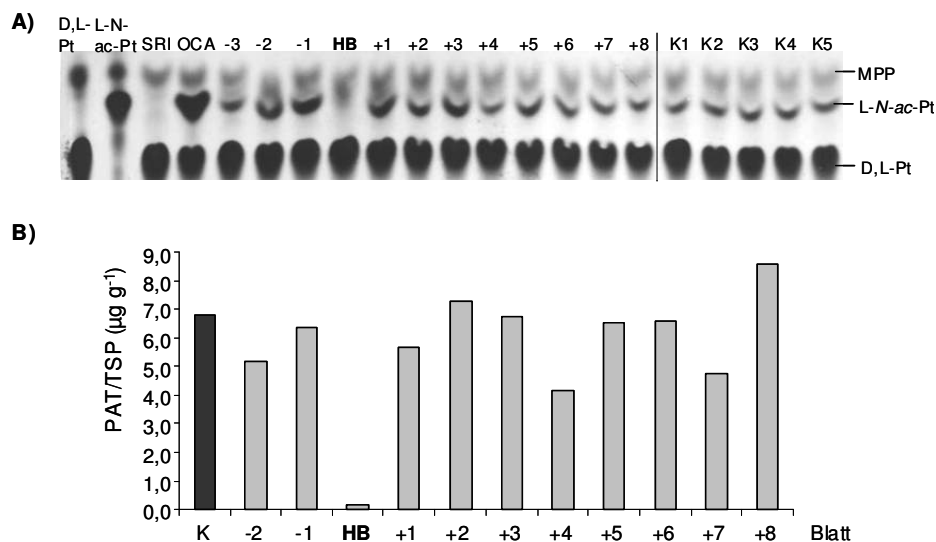


Abb. 42: Analyse der Transgenexpression aller Blätter einer *pat43-7* Tabakpflanze, bei der ein Blatt für 20 Tage bei 37 °C inkubiert wurde, sowie einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze.

A) Enzymaktivitätstest. Pflanzenextrakte wurden mit ^{14}C -D,L-Phosphinothricin (D,L-Pt) inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. B) Pat-ELISA von 100 µg TSP pro Blatt. K1 bis K5, Blätter 1 bis 5 der ungestressten Kontrollpflanzen; HB, hitzebehandeltes Blatt; +1 bis +8, Blätter 1 bis 8 der Signaltransferpflanze; SRI, Blatt einer niK, bei 24 °C kultiviert; OCA; Blatt der *patOCA-58*-Pflanze, bei 24°C kultiviert; L-N-Ac-Pt, L-N-Acetyl- ^{14}C -phosphinothricin, MPP, 3-Methyl-phosphinico-Propansäure

In Abb. 42 sind exemplarisch die Ergebnisse für die Pflanze *pat43-7* dargestellt, die an einem Blatt 20 Tage einem Hitzestress unterzogen wurde. Wie im Aktivitätstest konnte ich auch mittels ELISA keine deutliche Reduktion der Pat Konzentration in den unteren Blättern ermitteln. Eine deutliche Reduktion des Proteingehalts ist ausschließlich im hitzebehandelten Blatt zu detektieren. Für das Blatt +4 ist im Vergleich zu den anderen Blättern ein leicht reduzierter, im Blatt +8 ein leicht erhöhter Pat Gehalt festzustellen. Die Pat Gehalte in den übrigen Blättern variieren nur leicht. Die Unterschiede zwischen den Blättern lassen keinen hitzeinduzierten Signaltransfer erkennen.

Auch für *pat43* Pflanzen konnte keine durch ein mobiles Signal vermittelte Reduktion des Pat Proteins in nicht hitzebehandelte Pflanzenteile nachgewiesen werden.

C5.3 Die Hitzestress-induzierte Transgeninaktivierung ist auf 37 °C-behandelte Pflanzenteile beschränkt

Ein veränderter Versuchsaufbau zum Signaltransfer sollte die Korrektheit der bisher erzielten Ergebnisse überprüfen, um letzte Zweifel für die Möglichkeit der Vermittlung des Inaktivierungszustandes in nicht hitzebehandelte Pflanzenteile auszuräumen. Dazu wurde ein mittleres Blatt der Tabakpflanze *pat43-7* nur zur Hälfte durch die Aussparungen der Hitzekammer geführt, und die Ränder gut abgeklebt. Die eine Hälfte dieses Blattes wurde anschließend für 7 Tage bei 37 °C inkubiert, während die andere Hälfte ebenso wie die gesamte übrige Pflanze bei 24 °C kultiviert wurde (Abb. 43).

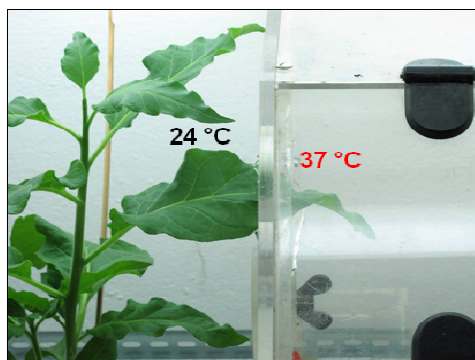


Abb. 43: Fotografische Aufnahme der Testpflanze *pat43-7*, dessen HB-Blatt nur zur Hälfte für 7 Tage bei 37 °C inkubiert wurde.

Beide Hälften dieses Blattes wurden getrennt geerntet und molekularbiologisch analysiert, um zu ermitteln, ob zwischen hitzebehandelten und unbehandelten Teil desselben Blattes die Reduktion des Pat Gehaltes vermittelt wird. Alle weiteren Blätter dieser Pflanze und einer isogenen Kontrollpflanze wurden als Kontrollen mitgeführt.

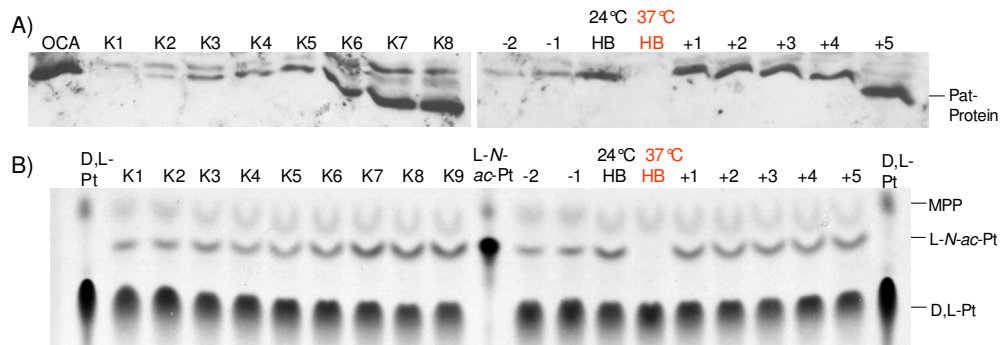


Abb. 44: Western Blot und Enzymaktivitätstest für alle Blätter einer *pat43-7*-Pflanze, bei der ein Blatt zur Hälfte 7 d bei 37 °C inkubiert wurde, sowie einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze.

A) Western-Blot-Analyse mit spezifischem Pat-AK von 80 µg TSP; ECL-Nachweis

B) Enzymaktivitätstest. Pflanzenextrakte wurden mit D,L-Pt inkubiert, die Metabolite mittels DC aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. K1 bis K9, Blätter 1 bis 9 der ungestressten Kontrollpflanzen; 24 °C-HB, Hälfte des hitzebehandelten Blattes, das bei 24 °C inkubiert wurde; 37 °C-HB, Hälfte des hitzebehandelten Blattes, das bei 37 °C inkubiert wurde; -2 bis +5, Blätter -2 bis +5 der Signaltransferpflanze; MPP, 3-Methylphosphinico-Propansäure

Während für die hitzebehandelte Hälfte des HB-Blattes kein Pat Protein im Western Blot und Enzymaktivitätstest detektiert wurde, konnte für die nicht gestresste Hälfte keine Reduktion des Pat Proteins oder von dessen Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 44). Die Expressionsstärke ist vergleichbar mit der im darüber liegenden Blatt. In beiden Pflanzen ist eine Zunahme der Pat Konzentration in den jüngeren Blättern zu beobachten, die insbesondere im Western Blot der Kontrollpflanze deutlich wird.

Zusätzlich wurden die Konzentrationen an *pat* mRNA und Pat Protein in den einzelnen Blättern mithilfe der qRT-PCR und des Pat-ELISA quantifiziert (Abb. 45). Mittels Pat-ELISA wurde ebenfalls eine deutliche Reduktion der Pat Proteinkonzentration im 37 °C-behandelten Teil des HB Blattes bis unterhalb der Nachweisgrenze deutlich, während der bei 24 °C kultivierte Teil dieses Blattes keine Reduktion zeigte. Insbesondere für die Kontrollpflanze konnte im Vergleich zum ältesten Blatt in den jüngeren Blättern eine Zunahme des Pat Gehaltes bis zum 7-fachen gemessen werden. Auch auf RNA-Ebene ist in den jüngeren Blättern eine Zunahme der spezifischen RNA zu beobachten. Im 37 °C-behandelten Teil des HB-Blattes führt der Hitzestress auch zu einer deutlichen Reduktion des *pat* mRNA 'steady state level' im Vergleich zum 24 °C-kultivierten Teil dieses Blattes. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Hitzestressversuchen, und zeigt dass der Hitzestress an *pat43*-Pflanzen nicht nur Einfluss auf das Protein- sondern auch auf das mRNA 'steady state level' ausübt. Des Weiteren zeigt der Vergleich zwischen den spezifischen RNA- und Proteingehalten der einzelnen Blätter, dass unter Kontrollbedingungen die Menge an *pat* mRNA und Pat Protein nicht immer miteinander korreliert. So ist in den Blättern +1 und +2

die größte Menge an spezifischer RNA, jedoch nicht an Pat Protein zu detektieren, was verschiedene Ursachen haben kann.

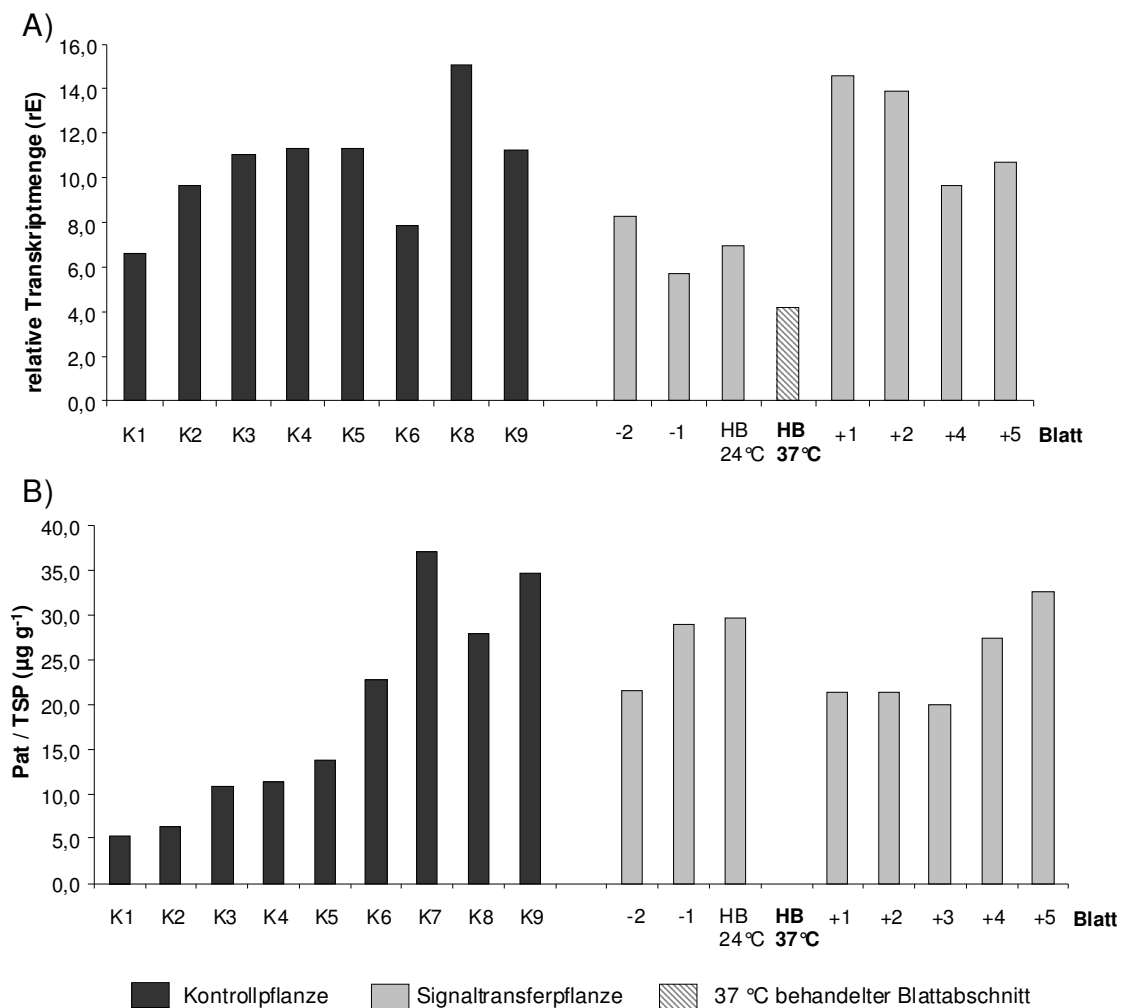


Abb. 45: Quantifizierung der *pat* mRNA- (A) und Pat Proteingehalte (B) der Blätter der Tabakpflanze *pat43-7*, bei der ein Blatt zur Hälfte 7 d bei 37 °C inkubiert wurde, sowie einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze.

A) Relative mRNA Gehalte gemessen mit qRT-PCR. B) Pat Proteingehalte ermittelt mit Pat-ELISA von 100 µg TSP pro Blatt. K1 bis K9, Blätter 1 bis 9 der ungestressten Kontrollpflanzen; HB 24 °C, ungestresster Blattabschnitt des hitzebehandelten Blattes; HB 37 °C, hitzebehandelter Blattabschnitt; -2 bis +5, Blätter -2 bis +5 der Signaltransferpflanze.

Wie hier kann es in wenigen Fällen auch zwischen Klonen unterschiedliche Pat Gehalte zwischen phänotypisch gleich entwickelten Blättern geben (z. B. Blatt K1 und -2). Es ist jedoch keine Abhängigkeit von der Hitzestressbehandlung eines Blattes erkennbar. Stattdessen scheint die *pat* Expression von unterschiedlichen Entwicklungszuständen der Blätter beeinflusst zu sein, die phänotypisch kaum zu detektieren sind.

Innerhalb desselben Blattes ist keine Vermittlung der hitzeinduzierten Transgeninaktivierung gegeben. Vor diesem Hintergrund ist es äußerst unwahrscheinlich, dass mithilfe eines mobilen Signals eine Vermittlung über größere Distanzen erfolgt.

D Diskussion

D1 Einfluss *cis*-regulatorischer DNA-Sequenzen auf das *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' unter optimalen Temperatur-Bedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *pat* Gene, die sich in der Zusammensetzung unterscheiden, hinsichtlich ihres Expressionsniveaus in Tabak SRI sowie in Kartoffel der Sorte Albatros untersucht. Die Quantifizierungen der durchschnittlichen *pat* mRNA- und Pat Protein 'steady state level' zeigten zwischen den unterschiedlichen Konstrukten teilweise signifikante Unterschiede in der Expression, die auf die Verwendung der verschiedenen *cis*-regulatorischen Sequenzen zurückzuführen waren. Die Ergebnisse werden im Vergleich zu bereits bekannten Einflüssen dieser Sequenzen diskutiert. Sich aufgrund dieser Arbeit neu ergebende Zielstellungen sollen in einem Ausblick dargelegt werden. Im Folgenden werden mögliche Ursachen für die unterschiedliche Expression der Konstrukte erörtert.

D1.1 Hat die Kodierregion einen Einfluss auf die *pat* Expression?

Die Quantifizierung des Pat Proteingehaltes in *pat43* Tabak- und Kartoffelpflanzen, die mit dem modifizierten Kodierbereich ausgestattet sind, ergab einen mehr als 4-fachen Anstieg im Vergleich zu den *pat40*-/*pat41*-Pflanzen, die die bakterielle *pat41* Kodierregion enthalten. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Köhne et al. (1998), die mithilfe von Western Blot Analysen keine Expressionsunterschiede feststellen konnten. Die Diskrepanzen beruhen jedoch vermutlich darauf, dass es sich bei der Western Blot Analyse um eine semiquantitative Methode handelt, während der hier eingesetzte Pat-ELISA mithilfe seiner Standardkurve eine sehr genaue Quantifizierung des Pat Proteins ermöglicht.

Der beobachtete Anstieg könnte mit der Codonoptimierung der synthetischen Kodierregion im *pat43* Gen assoziiert sein. Viele Transgene, die in Pflanzen eingebracht werden, stammen von Bakterien oder Pilzen, die sich häufig in ihrer Codonnutzung und ihrem GC-Gehalt von den Pflanzen unterscheiden (Murray et al., 1989). Auch der GC Gehalt des natürlichen *pat41* Kodierbereichs aus *Streptomyces viridochromogenes* liegt mit 69 % deutlich über den GC-Gehalten endogener Gene der dikotylen Pflanzen Tabak (43,5 %; Suo et al., 2006) und Kartoffel (42 %; Zhu et al., 2008). Die *pat* Kodierregion innerhalb des *pat43* Gens ist durch eine Reduktion des GC-Gehalts auf 49 % dagegen stärker an die Codonnutzung in diesen Pflanzen angepasst (Tabelle 11). Zusätzlich sind im Gegensatz zur bakteriellen in der

modifizierten Kodierregion überwiegend solche Basentriplets vorhanden, die auch in den Kodierbereichen endogener Tabak- und Kartoffelgene häufig benutzt werden (Anhang F2).

Tabelle 11: GC-Gehalte der unterschiedlichen *pat* Kodierbereiche im Vergleich zu endogenen Tabak- und Kartoffelgenen.

% GC	Tabak ⁽¹⁾	Kartoffel ⁽¹⁾	<i>pat41</i>	<i>pat40</i>	<i>pat43</i>
Kodierregion	43,38	42,40	69,93	68,58	49,00
1. Position	50,91	50,45	69,02	68,23	56,83
2. Position	39,69	39,18	47,28	47,39	47,54
3. Position	39,53	37,57	93,48	91,15	42,62

⁽¹⁾ Codon Usage Database <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Eine durch Codonoptimierung verursachte Expressionssteigerung in Tabak konnte u. a. bereits für das CYP73A17 Protein des Cytochroms P450 aus Weizen (Batard et al., 2000), für das humane knochenbildungsanregende Protein hBMP2 (Suo et al., 2006), sowie für die Insektenschädlichen Proteine Cry1A(b)- und Cry1A(c) aus *Bacillus thuringiensis* beobachtet werden, bei denen die Expression um das 100-fache gesteigert werden konnte (Perlak et al., 1991). Für Kartoffel konnte ebenfalls ein positiver Effekt der Codonoptimierung auf die Expression z. B. des viralen Antigens VP60 des ‘Rabbit Haemorrhagic Disease Virus’ (Mikschofsky et al., 2011) und der Hitze-labilen Enterotoxin B-Untereinheit (LT-B) aus *Escherichia coli* gezeigt werden (Mason et al., 1998).

Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass die Codonoptimierung die Effizienz der Translation der *pat43* mRNA erhöhte und höhere Pat Proteingehalte verursachte, indem Codons gebraucht werden, die häufiger in Tabak und Kartoffel verwendet werden.

D1.2 Hat die 5′ flankierende Region einen Einfluss auf die *pat* Expression?

Der Vergleich der *pat* Expression in *pat44*- und *patOCA* Pflanzen zeigte eine im Durchschnitt 60-fache Reduktion der *pat* mRNA und eine 25-fache Verringerung des Pat Proteins in den *pat44* Pflanzen. Diese könnte entweder auf die Verwendung unterschiedlich langer CaMV 35S Promotorfragmente (35S) oder verschiedener, synthetischer 5′ untranslatierter Regionen (5′ UTRs) zurückzuführen sein. Denn die 5′ UTR41 im *pat44* Gen ist mit einem 823 bp großen 35S Fragment, und die 5′ UTRS im *patOCA* Gen mit einem 534 bp großen 35S Fragment fusioniert, während die übrigen *pat* Gensequenzen beider Gene identisch sind.

Eine Studie von Odell et al. (1985) konnte keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen einem 941 bp- und einem 343 bp großem 35S Promotorfragment feststellen. Alle notwendigen Bereiche für eine starke, konstitutive Expression sind innerhalb des 343 bp Fragments enthalten, das daher als eigentlicher Promotorgilt. Beide hier verwendeten 35S

Promotorfragmente sind im 5' Bereich um die zusätzlichen Basenpaare verlängert. Während Köhne et al. (1998) die Ursache der unterschiedlichen Transkriptlevel zwischen den *patOCA*- und *pat41*-/ *pat43*-Linien in den unterschiedlich langen 35S Fragmenten sahen, konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Promotorlängen auf die Transkription nachgewiesen werden. Keines der beiden unterschiedlich langen 35S Fragmente ist mit einer signifikant höheren Transkription verbunden. Sowohl das kürzere Fragment im *patOCA*- und *pat46* Gen, als auch das längere Fragment im *pat50* Gen führte zu einer vergleichsweise hohen mRNA Akkumulation. Somit ist kein Hinweis auf einen Einfluss der 35S Promotorlänge auf das Expressionsniveau zu erkennen.

Ursächlich für die signifikant unterschiedlichen Transkriptlevel zwischen dem *patOCA* und dem *pat44* Gen sind daher wahrscheinlich eher die unterschiedlichen 5' UTRs. Die unterschiedlichen mRNA 'steady state level' sind entweder auf abweichende Transkriptionsraten, oder auf eine unterschiedliche Stabilität der mRNA zurückzuführen. Sequenzelemente, die die mRNA Stabilität bestimmen, sind laut Narsai et al. (2007) vornehmlich in der 3' UTR lokalisiert. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Studien, die den Einfluss der 5' UTRs auf die Stabilität der mRNA belegen, insbesondere bei der Lichtregulation (z. B. Bhat et al., 2004; Collados et al., 2006, Banerjee et al., 2009). Der Vergleich der Halbwertszeiten der *patOCA*- und *pat44* mRNA konnte jedoch keinen signifikanten Einfluss der 5' UTR auf die mRNA Stabilität aufzeigen.

Die 5' UTR könnte auch die Transkriptionsrate beeinflussen (Bolle et al., 1994; Amrolia et al., 1995; Curie & McCormick, 1997; Samadder et al., 2008). So berichteten Amrolia et al. (1995), dass die Transkription durch die Bindung von in *trans* agierenden Repressorproteinen in der 5' UTR herabgesetzt wird. Bolle et al. (1994) vermuteten dagegen, dass in *trans* agierende Faktoren, die an CT-reiche Regionen in der 5' UTR binden, die Transkriptionsrate des *GUS* Reportergens steigern. Pauli et al. (2004) konnten zeigen, dass die CT-reiche Region innerhalb der 35S RNA 5' UTR (S1 Region) in Kombination mit unterschiedlichen Promotoren eine Steigerung der *GUS* Expression verursacht. Die 5' UTRs enthält ebenfalls eine CT-reiche Sequenz CCCGGGGATCCTCT, die als Signalmotif für die Bindung eines in *trans* agierenden Faktors dienen und so eine Steigerung der Transkription im Vergleich zur 5' UTR41 verursachen könnte.

Auch für die mRNA Sekundärstruktur konnte ein Einfluss auf die Transkription gezeigt werden (Curie & McCormick, 1997). Um zu ermitteln, ob dies auch hier der Fall sein könnte, wurde die Ausbildung möglicher mRNA-Sekundärstrukturen mit dem Programm Mfold 2.3 von Michael Zuker (2003) untersucht. Die berechneten mRNA Sekundärstrukturen bei 24 °C zeigen eine kleine Haarnadelstruktur zu Beginn der 5' UTR41, die in der 5' UTRs nicht vorhanden ist

(Abb. D1). Curie & McCormick (1997) vermuteten, dass eine Haarnadelstruktur in der *LAT59* 5' UTR die Elongation der Transkription beeinträchtigt, indem sie das Fortschreiten der RNA Polymerase behindert. Dies wäre auch für die 5' UTR41 denkbar.

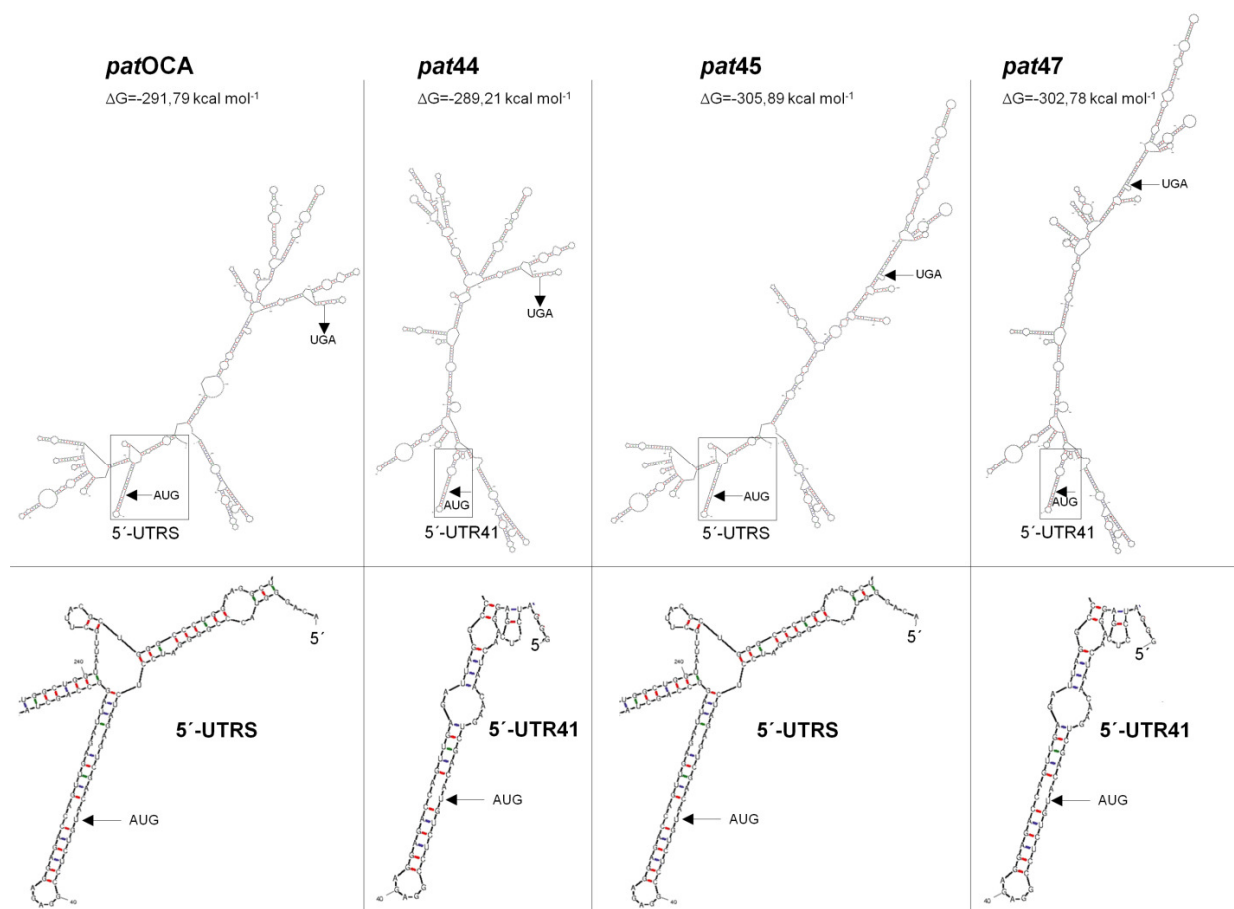


Abb. D1: Potentielle mRNA-Sekundärstrukturen der *patOCA*-, *pat44*-, *pat45*- und *pat47* mRNA berechnet mit Mfold 2.3 (Zuker, 2003) beginnend mit der 5' UTR und endend mit der Major Cleavage Site des 3' *camv*, sowie Ausschnitt des 5' Bereichs. Translationsstart und -stopp sind markiert.

Die Einbeziehung der Ergebnisse zum *pat47* Konstrukt, welches T. Latzkow in seiner Dissertation (2011) untersuchte, zeichnet jedoch ein gegensätzliches Bild. Das *pat47* Gen unterscheidet sich nur in der 5' UTR vom *pat45* Gen. Die 5' UTR41 im *pat47* Gen führte hier nicht zu einer Reduktion, sondern stattdessen zu einer 2-fach stärkeren Anreicherung der *pat* mRNA im Vergleich zur 5' UTRS im *pat45* Gen. Die 5' UTRs der *pat45*- und *pat47* mRNA falten sich jedoch analog zu denen in der *patOCA*- und *pat44* mRNA. Anhand dieser potentiellen Sekundärstrukturen lässt sich somit keine Korrelation zur Transkriptionsrate ableiten. Die mittels Mfold berechneten Sekundärstrukturen machen jedoch nur eine Aussage über die wahrscheinlichsten RNA-Faltungen unter Aufbringen der geringsten Energie. Ein Einfluss von internen Faktoren, wie z. B. RNA-bindenden Proteinen, die die Sekundärstruktur

beeinflussen, wird hiermit nicht berücksichtigt. So kann ein Einfluss von in *vivo* gebildeten abweichenden Sekundärstrukturen auf die Transkription nicht völlig ausgeschlossen werden.

Der Mechanismus, der zu den unterschiedlichen mRNA ‘steady state level’ führte, kann nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden. Die Bindung von in *trans* agierenden Faktoren, z. B. an die CT-reiche Sequenz in der 5′ UTRS könnte jedoch eine mögliche Ursache sein.

Die Bestimmung des Quotienten aus den durchschnittlichen Protein- und mRNA ‘steady state level’ der verschiedenen *pat* Gene ließ auch Unterschiede in der Umsatzrate des Transkripts zum Protein vermuten. Insgesamt schien die 5′ UTR41 mit einer höheren Translationseffizienz assoziiert zu sein als die 5′ UTRS. Die Rolle der 5′ UTR für die Initiation der Translation ist allgemein anerkannt (z. B. Kawaguchi & Bailey-Serres, 2002). Verschiedene Merkmale der 5′ UTR haben darauf einen Einfluss, inklusive des AUG Kontexts, des Vorhandenseins von AUG Codons stromaufwärts des Translationsstartpunktes (‘upstream open reading frames’), sowie der Länge der 5′ UTR und deren Sekundärstruktur stromabwärts und stromaufwärts des AUG Startcodons (Kozak, 2005).

‘Upstream open reading frames’ konnten weder in der 5′ UTRS noch in der 5′ UTR41 gefunden werden, und kommen somit als Ursache nicht in Frage. Die Länge beider 5′ UTRs ist mit 28 und 31 bp vergleichbar, und beträgt ca. $\frac{1}{3}$ der durchschnittlichen 5′ UTR Länge in Dikotyledonen (Kochetov et al., 2002). Auch der AUG Kontext mit der Sequenz $\overset{-3}{\text{G}}\overset{+1}{\text{A}}\overset{+4}{\text{C}}\text{AUGUC}$ ist in beiden 5′ UTRs identisch. Dieser weicht deutlich von der Konsensus-Sequenz $\overset{-3}{\text{A}}(\overset{+1}{\text{A/C}})\overset{+4}{\text{AAUGGC}}$ in Dikotyledonen ab (Joshi et al., 1997), was im Allgemeinen einen „schwachen“ Kontext ausmacht (Kozak, 1991). Länge und AUG Kontext sind demzufolge nicht ideal für eine starke Translationsinitiation. Sie sind jedoch in beiden verwendeten 5′ UTRs nahezu identisch und somit vermutlich nicht verantwortlich für abweichenden Translationseffizienzen.

Auch mRNA-Sekundärstrukturen spielen eine wichtige Rolle in der Translationsinitiation (Kozak, 1991). Dabei wirkt sich eine Haarnadelstruktur direkt stromabwärts des AUG in der Regel positiv aus, indem sie das Abtasten durch das Ribosom (Scanning) verlangsamt, wodurch das AUG Codon, auch im unvorteilhaften Kontext, erkannt werden kann (Kozak, 1990; 1991). Eine solche Haarnadelstruktur wird für jedes *pat* Gen berechnet (Mfold), unabhängig davon, ob die 5′ UTRS oder 5′ UTR41 verwendet werden (Abb. D1). Haarnadelstrukturen, die sich dagegen zwischen dem Cap und dem AUG Codon befinden, wirken sich in der Regel negativ auf die Initiation der Translation aus (Jobling & Gehrke 1987; Kozak, 1991). Daher überrascht es, dass für die 5′ UTR41 und nicht für die 5′ UTRS eine Haarnadelstruktur innerhalb der ersten 12 nt nach dem Cap berechnet wird. Eine Haarnadelstruktur in diesem Bereich verhindert

die Bindung der 40S Ribosomenuntereinheit an die mRNA (Kozak, 1989), und sollte damit Initiation der Translation herabsetzen, was jedoch nicht zu beobachten war. Ob die mit Mfold berechneten Sekundärstrukturen *in vivo* tatsächlich ausgebildet werden, ist jedoch, wie zuvor erwähnt, ungewiss.

Schließlich könnten die unterschiedlichen Primärsequenzen der beiden 5' UTRs die Ursache für die abweichenden Translationseffizienzen darstellen. Möglicherweise unterstützt die Sequenz des 5' UTR41 die Bindung von Translationsinitiationsfaktoren (eIFs). Eine erhöhte Translationsrate durch die gesteigerte Rekrutierung von eIFs konnte z. B. für das Ω Fragment des Tabakmosaikvirus gezeigt werden (Gallie, 2002). Gallie (2002) vermutete, dass die Ω poly(CAA) Sequenz direkt stromabwärts der Cap-Region dafür verantwortlich ist. Elemente, die Ähnlichkeiten mit dem Ω poly(CAA) Motif aufweisen (z. B. ACAAAA), wurden auch in den 5' UTRs von 36 Genen aus 16 Pflanzenspezies gefunden (Caspar & Quail, 1993), was eine funktionelle Bedeutung vermuten lässt. In der 5' UTR41 befindet sich die ähnliche Sequenz GAACTAACAA, die sich möglicherweise positiv auf die Rekrutierung von eIFs auswirkt.

Alternativ könnte an der Sequenz der 5' UTRS ein Repressorprotein binden (z. B. Sonenberg, 1994; Wilkie et al., 2003). Ein gut dokumentiertes Beispiel für eine Translationsrepression ist das 'iron regulatory protein', das an das 'iron response element' (IRE) in der 5' UTR bindet. Abhängig von der Position des IRE kommt es zur Inhibition der Bindung der 40S Ribosomenuntereinheit an die mRNA (Gray & Hentze, 1994) oder zu einer Störung des 'Scanning'-Prozesses (Paraskeva et al., 1999).

Als Ursache für die höheren Translationsraten in Verbindung mit der 5' UTR41 ist somit sowohl eine gesteigerte Rekrutierung von Translations-fördernden Faktoren an der 5' UTR41 als auch von Repressorproteinen an der 5' UTRS denkbar.

D1.3 Wird die *pat* Expression von Veränderungen in der 3' UTR Sequenz beeinflusst?

Als 3' UTR ist die Region definiert, die transkribiert jedoch nicht translatiert wird, und stellt somit den gesamten Bereich zwischen dem Translationsstoppcodon (TC) und der 'Cleavage Site' (CS) dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Verwendung unterschiedlicher 3' UTRs einen signifikanten Einfluss auf die *pat* Expression hat. Dazu wurden zum einen die Auswirkungen von vier verschiedenen Transkriptionsterminatoren (3'*camv*, 3'*nos*, 3'*ocs* und 3'*camvantisense*), und zum anderen von drei zusätzlich zwischen TC und Terminator eingebrachten Sequenzen (3' UTRS, 3' UTR41 und 3' UTR43) auf die *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die verschiedenen Terminatoren und unterschiedlichen 5'-Bereiche der 3' UTRs als auch die

unterschiedlichen Kombinationen beider Regionen Einfluss auf die *pat* Expression hat. So verursachte in Kombination mit dem 3′*camv* die 3′ UTRS (*patOCA*) ein 60-fach höheres mRNA ‘steady state level’ als die 3′ UTR41 (*pat45*), während in Kombination mit dem 3′*nos* die 3′ UTRS (*pat46*) nur zu ca. einem doppelt so hohen mRNA ‘steady state level’ führte als die 3′ UTR41 (*pat48*; Latzkow, 2011). Dies macht deutlich, dass die *pat* Expression letztlich vom Zusammenwirken der Sequenzen bestimmt wird. Dennoch sollen die einzelnen Bereiche hier getrennt betrachtet werden.

D1.3.1 Haben die unterschiedlichen Transkriptionsterminatoren einen Einfluss auf die *pat* Expression?

Die Verwendung des 3′*camv* verursachte eine signifikant stärkere *pat* Expression im Vergleich zum 3′*nos*. Dies bestätigt die Beobachtungen von Mitsuhara et al. (1996), die zeigten, dass der 3′*camv* effektiver als der 3′*nos* für eine starke *GUS* Expression in Tabak und Reis ist. Auch in einer Studie von Nagaya et al. (2010) konnte in Verbindung 3′*camv* eine signifikant höhere transiente *LUC* Expression in Arabidopsisprotoplasten detektiert werden. Die beobachtete höhere *pat* Expression in Verbindung mit dem 3′*camv* im Vergleich zum 3′*nos* ist demnach nicht überraschend.

Der 3′*nos* war zwar im Vergleich zum 3′*camv* mit einer signifikant geringeren Expression verbunden, diese war jedoch höher als die der Pflanzen, die den 3′*ocs* enthalten. Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass der 3′*nos* eine stärkere Expression verursacht als der 3′*ocs*. Der 3′*ocs* wird im Gegenteil häufig mit einer starken Expression in Verbindung gebracht (van Engelen et al., 1994) und findet daher beinahe ebenso häufig Verwendung in Pflanzenexpressionsvektoren (z. B. Chung et al., 2005), wie der 3′*nos* (Fischer & Schillberg, 2004). Nagaya et al. (2010) zeigten vergleichbare *LUC* Aktivitäten unabhängig davon ob der 3′*nos* oder 3′*ocs* verwendet wird. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit mit denen von Nagaya et al. (2010) ist eventuell auf die Verwendung verschiedener Reportergene zurückzuführen. So konnte Gallie et al. (1991) zeigen, dass sich die *LUC* und *GUS* Expression unter Kontrolle desselben Terminators deutlich unterschied. Auch die verschiedenen Expressionssysteme (transient - Nagaya et al., 2010 vs. stabil - diese Arbeit) könnten die unterschiedlichen Beobachtungen verursacht haben. Ingelbrecht et al. (1989) konnten zeigen, dass in einem transienten Tabakprotoplasten-Expressionssystem die Expression chimärer Gene, die unterschiedliche Terminatoren enthielten, vergleichbar war, während sich in stabil transformierten Blattgewebe die Expressionslevel stark unterschieden. Die Ergebnisse von Nagaya et al. (2010) stehen somit nicht zwingend im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

Ein in *antisense* orientiertes 3'*camv* Fragment (im *pat51* Gen) wurde erstmals in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Qualifikation als Transkriptionsterminator und Polyadenylierungssignal (Poly(A)-Signal) untersucht. Dieses Fragment lag in umgekehrter Orientierung und komplementär zur Sequenz des 3'*camv* stromabwärts des TC vor. Verglichen mit dem 3'*camv* im *pat50* Gen konnten in *pat51* Linien 50-mal weniger *pat* mRNA und sogar 600-mal weniger Pat Protein gemessen werden. Es ist wahrscheinlich, dass aufgrund der *antisense* Orientierung des 3'*camv* Fragments die passenden Signale für eine korrekte mRNA 3'-Endprozessierung nicht vorhanden sind. So besteht die Möglichkeit, dass viele unreife *pat51* mRNAs nicht polyadenyliert und aus dem Kern exportiert werden. Luo & Chen (2007) konnten in Arabidopsis zeigen, dass eine unkorrekt terminierte, unpolyadenylierte *GUS* mRNA im Kern als Template für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase dient, die die Produktion doppelsträngiger RNA (dsRNA) und damit 'posttranscriptional gene silencing' (PTGS) auslöst. Somit ist RNA Silencing als Ursache für die geringen *pat51* Expression denkbar.

Dass sich die Expression aufgrund unterschiedlicher Terminatoren unterscheidet (Ingelbrecht et al., 1991), ist nicht neu. Es ist jedoch bisher nur wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt. Viele Faktoren, die die Transkriptionstermination und Prozessierung reifer mRNA 3'-Enden beeinflussen, haben ebenfalls einen Einfluss auf die Initiation der Transkription, sodass die Prozesse wahrscheinlich miteinander verbunden sind (Proudfoot, 2000; 2004). Daher wird vermutet, dass die Terminations- und Poly(A)-Signale nicht nur einen Einfluss auf die Effektivität der Prozessierung, sondern auch auf die Transkriptionsrate haben. Die Prozessierung der mRNA 3'-Enden ist im Wesentlichen abhängig von der Anordnung der für die Polyadenylierung notwendigen Regionen. Dabei handelt es sich um das 'Far Upstream Element' (FUE), das 'Near Upstream Element' (NUE) und die 'Cleavage Site' (CS). Die NUE-Region mit der AATAAA-ähnlichen Sequenz liegt 10-30, die T-/TG-reiche FUE-Region 40 oder mehr Nukleotide stromaufwärts der CS (Mogen et al., 1990; Hunt, 1994; Rothnie, 1996). Während der 3'*camv* nur eine NUE-Region mit der Konsensus-Sequenz AATAAA enthält, sind sowohl für den 3'*nos* als auch den 3'*ocs* jeweils zwei beschrieben, von denen nur die kryptische des 3'*nos* die exakte Konsensus-Sequenz aufweist (siehe Anhang F2.3). Rothnie et al. (1994) konnten mithilfe von Mutationsanalysen des 3'*camv* AATAAA-Motivs zeigen, dass die im 3'*nos* und 3'*ocs* vorkommenden Sequenzen AATAAT und AATATA 100 %- bzw. über 90 % Effektivität in der Prozessierung von mRNA 3'-Enden aufweisen. In Pflanzen wird im Allgemeinen eine höhere Variabilität innerhalb dieses Motivs beobachtet (Joshi et al., 1987). Vor diesem Hintergrund erscheint es unwahrscheinlich, dass die Abweichung von der Konsensus-Sequenz einen Einfluss auf die Transkriptmengen hat.

Von den verwendeten Poly(A)-Signalen wurde bislang nur vom 3′*camv* die Effektivität von FUE-Sequenzen analysiert (Rothnie et al., 1994; 1996). So sind v. a. die TTTGTA Motive (zwei perfekte und zwei imperfekte Wiederholungen) für eine effektive Prozessierung von Bedeutung. Über die FUE-Regionen der beiden bakteriellen Poly(A)-Signale ist nur wenig bekannt, sodass sich keine Aussagen über ihre Effektivität im Vergleich zur FUE Region des 3′*camv* treffen lassen. Rothnie et al. (1994) konnten jedoch zeigen, dass das Einfügen der gesamten FUE-Region aus dem 3′*camv* stromaufwärts der kryptischen *nos* Stelle, die Prozessierung an dieser Stelle auf 47 % erhöht im Vergleich zu 7 % ohne diese Sequenz. Dies deutet darauf hin, dass die FUE-Region des 3′*camv* effizienter für die Erkennung der CS in Pflanzen ist als die des 3′*nos*. Über die Verwendung bestimmter Sequenzen des 3′*camv antisense* Fragments als FUE- und NUE Sequenzen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Die äußerst geringen *pat* mRNA ‘steady state level’ deuten auf eine ineffiziente Polyadenylierung hin, die vermutlich durch fehlende adäquate FUE- und NUE-Sequenzen verursacht wird.

Die Polyadenylierung, d. h. das Anhängen von Adenin-Nukleotiden findet an der CS statt. Das Vorkommen von mehr als einer CS ist in Pflanzen nicht ungewöhnlich (Xing et al., 2010), und wird u. a. für mehr als 25 % der Arabidopsis- und 50 % der Reisgene vermutet (Meyers et al., 2004; Shen et al., 2008). Dieses Phänomen wird auch als alternative Polyadenylierung bezeichnet, und spielt eine wichtige Rolle in der Genexpression, indem es die mRNA Stabilität, Translatierbarkeit und Fähigkeit zur Proteinbildung beeinflusst (Lutz & Moreira, 2011). Dabei wird eine negative Korrelation zwischen der Anzahl von mRNA 3′-Enden und dem Expressionslevel diskutiert (Yang et al., 2009).

Für den 3′*camv* konnten bislang zwei definierte CS identifiziert werden (Guerineau et al., 1991; Rothnie et al., 1994). In den verschiedenen *pat* Linien, die den 3′*camv* enthalten, konnte jedoch nur die Verwendung der Major CS nachgewiesen werden. Die homogenen 3′-Enden in Verbindung mit dem 3′*camv* tragen vermutlich zur höheren mRNA Akkumulation bei.

Vom 3′*ocs* konnte gezeigt werden, dass beide NUE Regionen zur Prozessierung von mRNA 3′-Enden an jeweils drei verschiedenen CS genutzt werden (MacDonald et al., 1991). Dies konnte ich auch für den 3′*ocs* im *pat49* Gen zeigen. Im Gegensatz zum 3′*camv* war hier keine Präferenz für eine CS zu erkennen. Nach meiner Schätzung kommt es bei weniger als 50 % der Transkripte zu einer Polyadenylierung an der Major CS, was eine hohe Heterogenität der mRNA 3′-Enden bedingt. Dies könnte sich negativ auf die mRNA Stabilität und damit auf die mRNA ‘steady state level’ ausgewirkt haben (Yang et al., 2009). Die Halbwertszeit der *pat49* mRNA wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, daher ist ein Einfluss der hohen Heterogenität der mRNA 3′-Enden auf die Stabilität der *pat49* mRNA nicht auszuschließen.

Für den 3′*nos* im *pat46* Gen konnte sowohl die Verwendung der drei von Bevan et al. (1983) beschriebenen CS gezeigt werden, als auch von zwei weiteren CS, die von Yang et al. (2009) für die Expression eines modifizierten Hausstaubmilben-Antigens *mDer f 2* nachgewiesen wurden. Yang et al. (2009) zeigten im Reisblatt die Verwendung von insgesamt 6 verschiedenen CS mit keiner deutlichen Präferenz für eine der CS. Sie vermuteten, dass die hohe Heterogenität der mRNA 3′-Enden die Stabilität der mRNA beeinflusst und zu einer geringen Akkumulation der mRNA führte. Im Gegensatz zu Yang et al. (2009) wurde der Hauptanteil der *pat46*-Transkripte an der Major CS polyadenyliert. So machten Transkripte mit davon abweichenden mRNA 3′-Enden insgesamt nur einen geringen Anteil der Transkripte aus. Daher ist anzunehmen, dass die mRNA Stabilität in den *pat46* Linien nicht in dem Maße beeinträchtigt wird, wie es Yang et al. (2009) für die *mDer f 2* Transkripte vermuteten. Dies könnte erklären, warum mithilfe der mRNA Halbwertszeitbestimmungen keine verminderte Stabilität der *pat46* mRNA nachgewiesen werden konnte.

In den *pat43* Linien kam es zusätzlich zum Überlesen (‘read-through’) der beschriebenen CS. So endete die Transkription einiger Transkripte erst stromabwärts des 3′*nos* Fragments. Für die beiden *pat* Gene, die den natürlichen Kodierbereich enthalten, war der Anteil an ‘read-through’-Transkripten sogar noch höher als in den *pat43* Linien. In den *pat41* Linien machten *pat* Transkripte, die CS stromabwärts des 3′*nos* verwenden, den Hauptanteil der Transkripte aus. Luo & Chen (2007) konnten bereits ‘read-through’ des 3′*nos* bei der *GUS* Expression unter Kontrolle des 35S Promotors nachweisen. Sie zeigten weiterhin, dass die Mehrheit dieser aberranten ‘read-through’-Transkripte unpolyadenyliert waren. Die Quantifizierung der *pat*mRNA ‘steady state level’ mittels qRT-PCR war von der cDNA Synthese beginnend am Poly(A)-Schwanz abhängig, sodass unpolyadenylierte Transkripte für die Quantifizierung nicht berücksichtigt wurden. Es wurden jedoch auch polyadenylierte ‘read-through’-Transkripte nachgewiesen. Ihr Anteil war umgekehrt proportional zum mRNA ‘steady state level’, was möglicherweise durch eine herabgesetzte Stabilität dieser read-through’-Transkripte verursacht wird. So konnten Kertész et al. (2006) und Schwartz et al. (2006) unabhängig voneinander einen destabilisierenden Effekt auf die mRNA feststellen, wenn die Distanz zwischen TC und Poly(A)-Schwanz mehr als 300 bp groß ist. Es konnte gezeigt werden, dass Transkripte mit verlängerter 3′ UTR durch ein mRNA Kontrollsystem, das auch als ‘nonsense-mediated decay’ (NMD) bezeichnet wird, schnell abgebaut werden (Haffani et al., 2000; Kertész et al., 2006; Schwartz et al., 2006). Die Erkennung und der gezielte Abbau dieser aberranten Transkripte durch NMD erfolgt vermutlich aufgrund der veränderten Distanz zwischen der Position des TC und des Poly(A)-Schwanzes (Muhlrad & Parker, 1999; Eberle et al., 2008). Die Halbwertszeiten der *pat40*- und *pat41* mRNA wurde nicht bestimmt. Die Halbwertszeit-bestimmung der *pat43*

mRNA zeigte jedoch keine verminderte Stabilität im Vergleich zu den Stabilitäten anderer *pat* mRNAs. Dies scheint im Widerspruch zur vermuteten höheren Instabilität der ‘read-through’-Transkripte zu stehen. Das Experiment zur Bestimmung der Halbwertszeit war jedoch so angelegt, dass zum einen nur polyadenylierte Transkripte in die Bestimmung der Halbwertszeit einbezogen wurden. Zum anderen wurden die transgenen Tabakblätter 30 Minuten mit Actinomycin D vorinkubiert, um sicher zustellen, dass der Wirkstoff seinen Wirkort erreicht hat. In diesem Zeitraum könnten sehr instabile Transkripte, wie z. B. polyadenylierte, aberrante Transkripte bereits abgebaut worden sein, sodass sie für die Bestimmung nicht berücksichtigt wurden. Vor diesem Hintergrund lässt sich somit nur feststellen, dass die nach 30 Minuten noch vorhandenen polyadenylierten Transkripte von den verschiedenen *pat* Genen sich hinsichtlich ihrer Stabilität nicht signifikant unterschieden. Die geringeren mRNA ‘steady state level’ in Verbindung mit einer verlängerten 3’ UTR könnten jedoch durchaus durch eine verringerte Stabilität aberranter, polyadenylierter und unpolyadenylierter mRNAs verursacht worden sein.

Für den 3’*camv* in *antisense* Orientierung (*pat51*) konnte eine noch höhere Heterogenität an 3’-Transkriptenden festgestellt werden als für den 3’*ocs*. So wurden in unterschiedlichen *pat51* Linien sowohl eine Reihe von mRNA 3’-Enden bestimmt, deren Polyadenylierung innerhalb des *antisense* Fragments erfolgte, als auch längere Transkripte, deren CS stromabwärts des *antisense* Fragments lagen. Somit entstanden in jeder *pat51* Linie mehrere, sich in ihren 3’-Enden unterscheidende mRNAs. Es war keine Präferenz für eine Polyadenylierungsstelle erkennbar. Es ist möglich, dass die Ausbildung der vielen verschiedenen mRNA 3’-Enden die geringen mRNA ‘steady state level’ verursachte. Zum Beispiel könnten viele der *pat51* Transkripte als aberrante mRNAs erkannt und mittels NMD abgebaut worden sein. Nicholson & Srivastava (2009) konnten auch für eine invertierte 3’*nos* Sequenz die Produktion aberranter Transkripte beobachten. Diese führten zur Induktion einer hohen Silencing-Rate, die auch für die *pat51* Linien vorstellbar ist. Möglicherweise ist das auch der Grund, warum eine Bestimmung der *pat51* mRNA Stabilität nicht möglich war. Es ist jedoch ungewiss, ob das geringe mRNA ‘steady state level’ einzig der geringen Stabilität der *pat51* mRNA zuzuschreiben ist, oder ob die Transkriptionsrate ebenfalls beeinträchtigt ist.

Für die geringeren mRNA ‘steady state level’ in Verbindung mit den 3’*ocs*, 3’*nos* und dem 3’*camv* in *antisense* Orientierung im Vergleich zum 3’*camv* kommen somit unterschiedliche Ursachen in Frage. Dazu zählen eine unterschiedliche Effizienz in der Prozessierung der mRNA 3’-Enden, die nach Proudfoot (2000; 2004) die Transkriptionsrate beeinflussen kann. Die Verwendung multipler CS im 3’*ocs* und 3’*camv antisense* und die damit einhergehende, vergleichsweise hohe Heterogenität der mRNA 3’-Enden kann eventuell die Stabilität der

mRNA herabgesetzt haben. Für den 3′*nos* konnte in den schwächer exprimierenden *pat41*-, *pat40*- und *pat43* Linien eine hohe Anzahl von aberranten ‘read-through’ mRNAs detektiert werden, die die Reduktion in der mRNA Abundanz ausgelöst haben könnten.

Die Expression wird scheinbar ebenfalls auf Ebene der Translation reguliert. So gibt es deutliche Unterschiede in den berechneten Umsatzraten der *pat* mRNA zum Pat Protein. Die *pat46* mRNA (3′*nos*) scheint schlechter translatiert zu werden als die *pat49*- (3′*ocs*) oder *patOCA* mRNA (3′*camv*). Auch bei zwei weiteren Genen, die sich in ihren Poly(A)-Signalen unterscheiden, war der 3′*camv* (*pat50*) mit einer besseren Umsatzrate assoziiert als der 3′*nos* (*pat43*). Es ist bekannt, dass die Poly(A)-Signale eine wichtige Rolle für die Translatierbarkeit der mRNA und/oder Translationseffizienz spielen. So fördert ein langer Poly(A)-Schwanz die Translationsinitiation durch Rekrutierung vieler Kopien des Poly(A)-Bindepoteins (PABP) an das 3′-Ende der mRNA (Gray et al., 2000; Sachs & Varani., 2000), was wiederum positiv mit der Translationseffizienz korreliert ist. Beilharz & Preiss (2007) konnten zeigen, dass die 3′ UTR die Adenylierung und damit die Translationseffizienz vieler mRNAs in Hefe beeinflusst. Bislang ist jedoch nichts über unterschiedliche Längen des Poly(A)-Schwanzes oder Translationseffizienzen zwischen 3′*camv* und 3′*nos* bekannt. Auch in den Northern Blot Analysen waren keine Unterschiede zwischen den *patOCA*- (3′*camv*) und *pat46*- (3′*nos*) Transkriptlängen zu erkennen, die auf unterschiedlich lange Poly(A)-Schwänze schließen lassen. Vor diesem Hintergrund sind die berechneten Differenzen der Translationseffizienzen nicht zu erklären.

Die *pat51* Transkripte waren in der Northern Blot Analyse nicht zu detektieren, sodass sich an dieser Stelle keine Aussage über die Länge der mRNA treffen lässt. Daher ist möglich, dass sowohl eine hohe Instabilität der mRNA als auch eine Beeinträchtigung der Translation durch eine unzureichende Polyadenylierung die geringen Protein ‘steady state level’ in den *pat51* Linien verursachte.

D1.3.2 Beeinflusst der 5′ Bereich der 3′UTR die *pat* Expression?

Der Vergleich der *pat* Expression zwischen *patOCA* Linien (3′ UTRS) und *pat45.2* Linien (3′ UTR41) zeigte eine signifikant stärkere Expression verbunden mit der kürzeren 3′ UTRS. Die noch kürzere 3′ UTR43 des *pat50* Gens verursachte eine weitere Steigerung der Expression im Vergleich zur 3′ UTRS im *pat44* Gen. Auch bei den Genen mit dem natürlichen Kodierbereich war die längere 3′ UTR41 im *pat41* Gen mit geringeren mRNA ‘steady state level’ verbunden als die um 42 bp verkürzte 3′ UTR des *pat40* Gens.

Die zusätzlichen Nukleotide im 5'-Bereich der 3' UTRs beeinflussten v. a. die mRNA 'steady state level'. Der Einfluss der zusätzlichen Nukleotide könnte darin bestehen, dass die Sequenz Motive aufweist, die die mRNA Stabilität oder Transkriptionsrate beeinträchtigen. Ein Einfluss für stromabwärts der Kodierregion lokalisierte Sequenzen auf die Transkriptionsrate konnte bereits gezeigt werden (Dean et al., 1989). So wirken sich z. B. der CaMV Enhancer und der Enhancer der 5' nicht kodierenden Region des β -Conglyciningens aus Sojabohne förderlich auf die Expression aus, wenn sie stromabwärts der Kodierregion des Reportergens platziert werden (Nagy et al., 1987; Chen et al., 1988). Ein positiver Einfluss der zusätzlichen Nukleotide im 5'-Bereich der 3' UTR war hier nicht zu beobachten. Es ist jedoch möglich, dass die zusätzlichen Nukleotide die Prozessierung der mRNA 3'-Enden beeinträchtigen, was einen negativen Effekt auf die Transkriptionsrate haben kann (Proudfoot, 2004).

Auch bestimmte Sequenzen in der 3' UTR verschiedener mRNAs, die eine erhöhte Instabilität der mRNA verursachen, konnten bereits identifiziert werden. So wurden z. B. für die 'Downstream'-Elemente der *SAUR* Transkripte aus Soja (Newman et al., 1993) oder für AUUUA-Motive (Ohme-Tagaki et al., 1993) eine mRNA-destabilisierende Wirkung nachgewiesen. Solche Motive befinden sich jedoch nicht in den 5' Bereichen der 3' UTRs.

Neben der Sequenz der zusätzlichen Nukleotide könnte auch die durch ihre Präsenz erhöhte Länge der gesamten 3' UTR Region eine verringerte mRNA Stabilität verursacht haben. Kertész et al. (2006) und Schwartz et al. (2006) zeigten dies jedoch erst bei einer Distanz von mehr als 300 bp zwischen TC und Poly(A)-Schwanz. Die durchschnittliche Länge pflanzlicher 3' UTRs liegt bei ca. 200 bp (Pesole et al., 2002). Bei den *pat* Konstrukten lag die Distanz zwischen dem TC und der Major CS z. B. bei 198 bp für die *patOCA* Transkripte und 231 bp für die *pat45* Transkripte. Ob es auch bei einer Länge der 3' UTR zwischen 200- und 300 bp und nicht nur über 300 bp einen negativen Einfluss auf das mRNA 'steady state level' gibt, ist bisher nicht beschrieben.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die zusätzlichen Nukleotide zwischen TC und Major CS des 3'*camv* und 3'*nos* die Erkennung der Terminations- und Poly(A)-Signale herabsetzen, und diese z. T. überlesen ('read-through') werden. So zeigte sich z. B., dass es bei den *pat41* Linien, die die längere 3' UTR₄₁ enthalten, wesentlich häufiger zum 'read-through' des 3'*nos* kommt als in den *pat40* Pflanzen, die stattdessen eine Deletion im 5' Bereich der 3' UTR aufweisen. Für den 3'*camv* der *pat45.2* Linien konnten in dieser Arbeit keine polyadenylierten 'read-through'-Transkripte detektiert werden. Laut Luo & Chen (2007) könnte es jedoch für den 3'*camv* auch zur Bildung unpolyadenylierter, und dadurch sehr instabiler 'read-through'-Transkripte gekommen sein, was die signifikant geringeren mRNA 'steady state level' im Vergleich zu *patOCA* verursacht haben könnte. Es war nicht möglich

unpolyadenylierte Transkripte im Experiment zur mRNA Halbwertszeitbestimmung mit der qRT-PCR zu detektieren, sodass dies nicht im Widerspruch zur Beobachtung steht, dass die *pat45.2*- und *patOCA* mRNA sich nicht in ihrer Stabilität unterscheiden.

Die zusätzlich in den 5' Bereich der 3' UTRs eingebrachten Nukleotide üben einen signifikanten Einfluss auf die *pat* Expression aus. Dabei war die Länge dieser Sequenzen umgekehrt proportional zum *pat* mRNA 'steady state level'. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte jedoch nicht aufgeklärt werden.

D2 Welche Faktoren beeinflussen die Inter-Transformant-Variabilität?

Die Inter-Transformant-Variabilität des Pat Protein 'steady state levels' in Tabak schwankte stark innerhalb der verschiedenen *pat* Gene, von 2,7- bis 3,4-fachen Expressionsunterschieden für die *pat51*-, *pat41*- und *patOCA* Linien bis hin zu 22,9- bis 34,1-fachen Unterschieden für die *pat46*-, *pat44*- und *pat45.2* Linien. Eine hohe Variabilität der Transgenexpression zwischen unabhängigen Transformanten konnte bereits mehrfach gezeigt werden (z. B. Jones et al., 1985; Hobbs et al., 1990; Peach & Velten, 1991). In diesen Studien lagen die Inter-Transformant-Variabilitäten zwischen 8- und mehr als 200-fach für unterschiedliche Reportergene. In den unterschiedlichen Studien konnte z. B. für die *GUS* Expression Schwankungen im Expressionslevel um das 8-fache (Hobbs et al., 1990) bis um das 175-fache (Peach & Velten, 1991) detektiert werden.

Variationen im Transgenexpressionslevel werden mit verschiedenen Faktoren assoziiert, zu denen u. a. die Kopienzahl und der Integrationsort des Transgens in das Pflanzengenom, somaklonale Variationen infolge der Gewebekultursowie die physiologische Variabilität (z. B. Jones et al., 1987; Hobbs et al., 1990; Filipecki & Malepszy, 2006) gehören. Durch Standardisierung der Kultivierungsbedingungen war es möglich den Einfluss der physiologischen Variabilität auf ein geringes Maß zu reduzieren. So waren unabhängig vom *pat* Konstrukt die Variationen zwischen Klonen stets geringer als 30 %. Dies trifft auch zwischen Klonen zu, die das *pat44*-, *pat45*- oder *pat46* Gen enthalten, für die Inter-Transformant-Variabilitäten von mehr als 85 % gemessen wurden.

Die Konfiguration der T-DNA am Integrationsort, d. h. die Anzahl an Kopien und die Art, wie sie angeordnet sind, kann einen wesentlichen Einfluss auf die Expression haben (z. B. Muskens et al., 2000). Im Vergleich zur biolistischen Transformation erhält man mit dem *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer weniger T-DNA Integrationen, und viele der Integrationen sind auch nahezu perfekt, beginnend mit der 'Right Border' der T-DNA und endend mit der 'Left Border'. Gelegentlich kann es jedoch zu komplexen Integrationen bestehend aus

mehreren Kopienkommen, die auch verkürzt sein können (Übersicht in Muskens et al., 2000). Es wurde häufig ‘transcriptional gene silencing’ (TGS) gezeigt, wenn Transformanten mehrere Kopien an einem Integrationsort aufwiesen (z. B. Hobbs et al., 1993; Jorgensen et al., 1996; Muskens et al., 2000). Dies wird damit begründet, dass die Kopien in Form tandemartig angeordneter, direkter oder umgekehrter Wiederholungen (‘direct / inverted repeats’) vorliegen, wodurch Homologie-abhängiges *cis*-TGS induziert wird (Vaucheret & Fagard, 2001). Ausgehend von einem inaktivierten Locus kann es auch zum ‘Silencing’ weiterer homologer Loci *in trans* kommen (Übersicht in Fagard & Vaucheret, 2000; Muskens et al., 2000). Mittels Southern Blot Analysen wurde die Anzahl an T-DNA Insertionen in das Tabak- und Kartoffelgenom untersucht. Die Kopienzahl schwankte zwischen 1 und 5, überwiegend traten Transformanten mit einer oder zwei Kopien auf. Es konnte keine durchgehend positive oder negative Korrelation zum Expressionslevel beobachtet werden. So waren unter den *pat46* Linien mit mehr als zwei Kopien sowohl solche mit der höchsten als auch mit der geringsten Expression innerhalb dieses Konstrukts. Es lässt sich jedoch auch feststellen, dass die geringste Expression innerhalb eines Konstruktes stets für Transformanten mit mindestens zwei Kopien des Transgens detektiert wurde. Dies lässt vermuten, dass die geringen Expressionslevel vom Vorliegen homologer Regionen abhängig sein können. Die Southern Blot Analyse ist nur bedingt geeignet, Wiederholungen an einem Integrationsort aufzuzeigen, insbesondere wenn partielle Duplikationen der inserierten DNA vorliegen (Fagard & Vaucheret, 2000). Zudem konnte mit der hier eingesetzten Southern Blot Analyse z. B. von den *pat44*- und *pat50* Linien das Vorliegen von nur zwei Kopien an einem Integrationsort angeordnet als ‘inverted repeat’ (IR) nicht von zwei getrennt inserierten Kopien unterschieden werden. Somit ist nicht auszuschließen, dass Fälle von IRAuftraten, die ‘Gene Silencing’ induziert haben könnten.

Das Vorliegen homologer Regionen könnte auch PTGS ausgelöst haben (Palauqui & Vaucheret, 1995; Elmayan & Vaucheret, 1996; Que et al., 1998). In deren Verlauf kommt es zur Bildung dsRNA, aus der von einem Dicer ‘small interfering’ (si)RNAs generiert werden. Die siRNAs werden in einen Multi-Komponenten-Nuklease-Komplex (RISC) inkorporiert, und können diesen zur homologen Ziel-RNA leiten, die schließlich abgebaut wird. Somit könnte sowohl TGS als auch PTGS vergleichsweise geringe Expressionslevel induziert und damit zur Inter-Transformant-Variabilität beigetragen haben.

Auch unterschiedliche Integrationsorte können zu unterschiedlich starker Transgenexpression führen. Dies wird damit begründet, dass Transgene zufällig in das Genom inserieren, sodass sie abhängig von ihrer Position von Eu- oder Heterochromatin umgeben sind. Man spricht dabei von Positions- oder Integrationsorteffekten. Wird die T-DNA in oder in die Nähe repetitiver Sequenzen oder heterochromatischer DNA-Regionen eingebaut, die stark methyliert sind, kann

dies dazu führen, dass auch das Transgen selten abgelesen wird. Die Methylierung kann auch auf das Transgen übergehen und es damit stilllegen (Pröls & Meyer, 1992; Park et al., 1996). Die transgenen Tabak- und Kartoffeltransformanten wurden auf Phosphinothricin-haltigen Medium selektioniert, d. h. Transformanten, die aufgrund einer Transgeninaktivierung eine für eine Resistenz nicht ausreichende *pat* Expression aufwiesen, wurden für die Bestimmung der Inter-Transformant-Variabilität gar nicht erst berücksichtigt. Die Inter-Transformant-Variabilitäten könnten somit real höher sein als sie hier bestimmt wurden.

Wird die T-DNA in euchromatische, transkriptionell aktive Regionen inseriert, kann die Transgenexpression durch regulatorische Sequenzen benachbarter Wirtsgene beeinflusst werden (Überblick in Stam et al., 1997). Dies wurde von Breyne et al. (1992) eindrucksvoll gezeigt. Sie wiesen nach, dass eine geringe Distanz des *GUS* Reportergens zur 'Right Border' (RB) größere Inter-Transformant-Variabilitäten verursachte, als wenn die Distanz durch ein dazwischen lokalisiertes zweites Gen relativ hoch ist. Dies könnte auch die unterschiedlichen Inter-Transformant-Variabilitäten erklären, die für die *pat* Gene beobachtet wurden. Die geringe Distanz des *pat44*-, *pat45.2*- und *pat46* Gens zur RB (ca. 50-150 bp) könnte einen stärkeren Einfluss des Integrationsortes bedingen. Dagegen ist in den Vektoren pIB16.41 (*pat41*), pIB16.40 (*pat40*), pSK16.43 (*pat43*) und pOCA/Ac (*patOCA*) die Distanz zur RB relativ hoch. Bei allen vier T-DNAs ist zwischen dem *pat* Gen und der RB das *nptII* Gen lokalisiert, und tatsächlich wurden für diese vier Konstrukte geringere Inter-Transformant-Variabilitäten der *pat* Expression detektiert. Die Analyse der Inter-Transformant-Variabilität des zweiten Transgens auf der T-DNA (*nptII*), könnte die Vermutung, dass die Inter-Transformant-Variabilität von der Distanz zur RB beeinflusst wird, verifizieren.

Der Einfluss des Integrationsortes lässt sich mithilfe des Vergleichs der Expression von Transformanten mit nur je einer Kopie des *pat* Transgens ermitteln. Unter den *pat44* T₀-Transformanten befanden sich 9 mit je einer Kopie. Diese variierten in ihren Proteingehalten um das 10-fache, und damit z. B. deutlich stärker als De Buck et al. (2004) für die *GUS* Expression in *Arabidopsis thaliana* feststellen konnten. Die Inter-Transformant-Variabilität lag dort im selben Bereich wie die Intra-Transformant-Variabilitäten (< 4-fach). Dies lässt vermuten, dass in Tabak ein deutlich stärkerer Einfluss des Integrationsortes vorliegt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Day et al. (2000). Sie analysierten in Tabak ebenfalls für die *GUS* Expression die Inter-Transformant-Variabilitäten von Transformanten mit je einer Kopie. Sie konnten Expressionsunterschiede um das 10-fache detektieren, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist. De Buck et al. (2004) begründeten den geringen Einfluss von Positionseffekten in *Arabidopsis* mit der geringeren Anzahl an heterochromatischen DNA-Regionen. Day et al. (2000) konnten

herausfinden, dass eine geringe *GUS* Expression mit DNA-Methylierungen in Promotor, Kodierregion und/oder 3' UTR korrelierte. In dieser Arbeit wurden weder die Methylierungsmuster des *pat* Transgens noch die Integrationsorte untersucht. Somit könnten sowohl T-DNA-Integrationen in Euchromatin als auch in Heterochromatin zu den höheren Inter-Transformant-Variabilitäten der *pat44*- bis *pat46* Transformanten beigetragen haben.

Zusammenfassend steht zu vermuten, dass die hohen Inter-Transformant-Variabilitäten der *pat44*-, *pat45.2*- und *pat46* Transformanten in erster Linie durch die unterschiedlichen Integrationsorte verursacht werden. Homologie-abhängiges 'Gene Silencing' in einigen der gering exprimierenden Linien kann jedoch ebenfalls zur hohen Inter-Transformant-Variabilität beigetragen haben. Die geringeren Inter-Transformant-Variabilitäten der *pat40*-, *pat41*-, *pat43*- und *patOCA* Linien werden vermutlich dadurch verursacht, dass aufgrund der hohen Entfernung ihres *pat* Gens zur RB, die *pat* Expression weniger vom Integrationsort beeinflusst wird.

D3 Einfluss *cis*-regulatorischer DNA-Sequenzen auf das *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' unter moderatem Hitzestress

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich die Ergebnisse von Köhne et al. (1998) bestätigen, die zeigten, dass die Kombination aus 5' UTR41 und 3' *nos* im *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Gen nach 10-tägiger Kultivierung bei 37 °C durch den reversiblen Verlust der Phosphinothricinresistenz in allen untersuchten Linien gekennzeichnet ist, während die Kombination aus 5' UTRS und 3' *camv* im *patOCA* Gen zu einer Stabilisierung, oft sogar einer Erhöhung der Expression unter moderatem Hitzestress führt. Ziel dieser Arbeit war herausfinden, welche Mechanismen die unterschiedlichen Regulationen hervorrufen.

D3.1 Warum sind definierte Standards zur Beurteilung der Reaktion auf moderaten Hitzestress notwendig?

Sandra Kerbach (1999) konnte für die *pat44* Linien zeigen, dass im Gegensatz zu den *pat43*-Linien die Reduktion des Pat Proteins weniger deutlich ausfiel, und nicht zum Verlust der Herbizidresistenz führte. Von den in dieser Arbeit untersuchten *pat44* Linien wurden bei 3 in der T₁-Generation zwischen Geschwistern unterschiedliche Reaktionen unter Hitzestress beobachtet, die unabhängig von Kopienzahl und Integrationsort des Transgens war. Einige der Geschwister zeigten eine stabile Expression unter Hitzestress, andere dagegen eine Abnahme. Auch Geschwister verschiedener *pat45.2*- und *pat46* Linien unterschieden sich in ihrer

Reaktion. Hier schwankten die Geschwister allerdings zwischen stabil und Zunahme der *pat* Expression unter Hitzestress. Es stellt sich die Frage, warum zwischen Geschwistern unterschiedliche Expressionsmuster auftraten.

Für die Analyse der *pat* Expression unter Hitzestress wurde stets die Expression von voll entwickelten, nicht seneszenten Blättern des Kontroll- und hitzebehandelten Klon miteinander verglichen. Die Möglichkeit, dass sich trotz standardisierter Kultivierungsbedingungen phänotypisch gleich entwickelte Blätter in einem unterschiedlichen physiologischen Zustand befinden, ist nicht völlig auszuschließen und konnte z. B. in einzelnen Versuchen zur systemischen Ausbreitung der *pat* Inaktivierung demonstriert werden. Williamson et al. (1989) konnten in Tabak und van Leeuwen et al. (2001) in Petunie nachweisen, dass die Expression unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors u. a. vom Entwicklungsstadium des Blattes (jung oder alt) bestimmt wird. Zudem zeigten sie, dass die Expression ebenfalls von der Blattsektion (Blattspitze, -mitte, -basis) abhängt. In dieser Arbeit wurde nicht durchgängig darauf geachtet, nur eine bestimmte Blattsektion zu untersuchen. Somit sind leichte Unterschiede im analysierten Blattmaterial nicht auszuschließen. Da die Expressionsunterschiede zwischen Kontrolle und hitzebehandeltem Klon z. T. relativ gering waren, könnten selbst solche leichten Unterschiede im analysierten Blattmaterial die unterschiedlich erscheinenden Hitzestressreaktionen zwischen Geschwistern verursacht haben. Diese Beobachtung machte es notwendig, die *pat* Expression unter moderaten Hitzestressbedingungen nach bestimmten Kriterien zu beurteilen. Die Hitzestressversuche an T₀-Transformanten wurden mindestens einmal wiederholt, nur reproduzierbare Ergebnisse wurden gewertet. Zudem wurde die *pat* Expression unter Hitzestress nur dann als Abnahme interpretiert, wenn die Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und hitzegepressten Klon gegenüber physiologischen Unterschieden zwischen ungestressten Klonen überwogen. In der T₁-Generation wurde nur dann, eine Reduktion der *pat* Expression als eine von Hitzestress verursachte Reaktion beurteilt, wenn die Reduktion in allen Geschwistern (mindestens 6) einer Linie auftrat.

D3.2 Warum verursacht die Kombination aus 5' UTR41 und 3' nos stets eine Inaktivierung der *pat* Expression, ihre alleinige Präsenz jedoch nicht?

Nach Köhne et al. (1998) waren die reduzierten mRNA 'steady state level' der *pat40*- und *pat41* Linien unter Hitzestress weder vom Integrationsort des Transgens in das Pflanzen-genom, von der Anzahl der T-DNA-Insertionen noch vom hemi- oder homozygoten Zustand des Transgens beeinflusst. Als Ursache vermuteten sie, dass der deutlich höhere GC Gehalt der natürlichen *pat41* Kodierregion im Vergleich zum umgebenden, pflanzlichen Genom zur

Inaktivierung des Transgens auf Transkriptionsebene führte. Ein solcher Mechanismus wurde bereits beschrieben (Meyer et al., 1993; Elomaa et al., 1995), er war aber stets von einer DNA-Methylierung begleitet. Änderungen im DNA-Methylierungsmuster konnten für die *pat41* Linien jedoch nicht detektiert werden. Zudem war die Reaktion reversibel, wenn die Kultivierung zur normalen Temperatur zurückkehrte (Neumann et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der GC Gehalt keine Rolle spielt, da trotz der Adaptation der Kodierregion (*patS*) an den pflanzlichen GC Gehalt und Codongebrauch alle *pat43* Linien ebenfalls eine hitzeinduzierte Reduktion der mRNA ‘steady state level’ zeigten. Daher müssen andere Regulationsmechanismen für die hitzeinduzierte Transgeninaktivierung verantwortlich sein.

Im einfachsten Fall wird unter Hitzestress die Transkription dieser drei *pat* Gene herabgesetzt. Die Integration erfolgt jedoch zufällig in das pflanzliche Genom, und damit auch in Bereiche, die unter Hitzestress aktiv sind. Daher müsste die Transgensequenz selbst die Inaktivierung verursachen. Der 35S Promotor und *patS* Kodierbereich scheiden als Ursache aus, da sie auch Bestandteil der unter Hitzestress stabilen *pat* Gene sind. Möglicherweise könnten 5′ UTR41 und 3′*nos* unter Hitzestress die Bildung unabhängiger, heterochromatischer und damit inaktiver DNA-Regionen induzieren. Ein solcher Regulationsmechanismus wurde meines Wissens jedoch bislang nicht beschrieben.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass es unter Hitzestress zu einer verstärkten Expression oder Stabilität eines Repressorproteins kommt, dass sowohl Regionen des 5′ UTR41 als auch des 3′*nos* bindet, und so die Expression des *pat40*- bis *pat43* Gens unter Hitzestress herabsetzt. Repressorproteine kontrollieren die Expression endogener Gene, somit müssten zufällige Sequenzübereinstimmungen zwischen diesen Transgensequenzen mit endogenen Sequenzen bestehen. Die Suche nach ähnlichen Sequenzen im Tabak- und Arabidopsisgenom (NCBI – Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); TAIR-BLAST) lieferte für beide Sequenzen zwar durchaus Übereinstimmung von bis zu 20 bp langen Fragmenten, die für eine Proteinbindung ausreichen würden (z. B. Guiliano et al., 1988; Jin et al., 1998). Für diese endogenen Sequenzen konnte bislang jedoch keine Bindung durch ein regulatorisches Protein nachgewiesen werden.

Die Beteiligung stressinduzierter miRNAs ist aus folgenden Gründen unwahrscheinlich. Bei miRNAs handelt es sich um 19 bis 24 nt große RNAs, die PTGS von komplementären, endogenen mRNAs wie z. B. mRNAs von Transkriptionsfaktoren induzieren. Dies führt jedoch nur zum mRNA-Abbau, wenn die miRNA eine perfekte Komplementarität zur Ziel-mRNA zeigt. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, dass eine hitzestressinduzierte miRNA zufällig perfekt komplementär zu einem Bereich der *pat40*-, *pat41*- und *pat43* mRNA ist. Zudem kommen

5' UTR41 auch im *pat44*- und *pat50* Gen vor, und der 3'nos ebenfalls im *pat46* Gen. Ist eine miRNA komplementär zu einem dieser beiden Bereiche, sollte auch in einem dieser beiden Fälle PTGS in allen untersuchten Linien verursacht werden. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Eine Ursache könnte in der Struktur der T-DNA liegen. Im Gegensatz zu allen weiteren *pat* T-DNAs liegen in den T-DNAs des pIB16.41, pIB16.40 und pSK16.43 das *nptII* Gen und das jeweilige *pat* Gen in umgekehrter Orientierung vor, und beide enthalten den 3'nos als Polyadenylierungssignal (siehe Anhang F1). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass der 3'nos nicht mit einer vergleichbar starken Transkriptionstermination verbunden ist wie z. B. der 3'*camv*. Die Transkription nicht weniger Transkripte endet nicht am 3'nos, sondern wird darüber hinaus fortgeführt, möglicherweise bis in den 3'nos des *nptII* Gens hinein. Dieses 'read-through' kann unter Hitzestress sogar verstärkt werden. Takahashi & Komeda (1992) konnten z. B. zeigen, dass in *Arabidopsis* unter Hitzeschock sehr lange rRNAs aufgrund von 'read-through' ihrer Transkriptionsterminationssignale gebildet werden. In dieser Arbeit konnte auch für die *pat40*-Transkripte eine Zunahme des 'read-through' des 3'nos unter Hitzestress gezeigt werden. Wenn die Transkription nicht am 3'nos terminiert wird, kann es zur Bildung von IR-Transkripten kommen, bei denen die *antisense* RNA-Bereiche die komplementäre *sense* mRNA binden. Aus der so gebildeten dsRNA können siRNAs generiert werden, die den Abbau der homologen Ziel-RNA induzieren. Wang & Waterhouse (2000) konnten zeigen, dass IR-Strukturen wesentlich effizienter für die Induktion von Silencing sind als einfache *sense* und *antisense* Strukturen. Ein so bereits induziertes PTGS könnte durch den Hitzestress zusätzlich verstärkt worden sein. So konnte gezeigt werden, dass die Produktion von siRNAs temperaturabhängig ist (Fortier & Belote, 2000; Komeda et al., 2004). Szitty et al. (2003) beobachteten z. B., dass in den drei Dikotyledonen *Nicotiana benthamiana*, *Solanum tuberosum* und *Arabidopsis thaliana* in dem von ihnen untersuchten Temperaturbereich von 15 °C bis 27 °C die Produktion von siRNAs und damit das RNA Silencing zunahm. Eine weitere Zunahme bis zu 37 °C ist nicht auszuschließen.

Mithilfe einer Northern Blot Analyse sollte die Beteiligung von spezifischen siRNAs an der Regulation ermittelt werden. Ein Nachweis ist mir jedoch nicht gelungen, was eventuell mit der geringen Sensitivität der Methode gegenüber den unterrepräsentierten siRNAs einhergeht. So konnte ein Anteil von weniger als 0,4 % spezifischer siRNA am eingesetzten Gemisch aus kleineren RNAs (inklusive unspezifischer si- und miRNAs, 5,8S-, 5S rRNA und tRNAs) mit diesem Nachweissystem nicht detektiert werden. Zudem reichte die eingesetzte Sonde nicht über den gesamten 3'nos Bereich (siehe Abb. 30), sodass siRNAs, die zum 100 bp großen Bereich stromaufwärts der CS komplementär sind, nicht detektiert werden konnten.

Trotz des fehlenden Nachweises spezifischer siRNAs ist ‘Gene Silencing’ auf posttranskriptioneller Ebene ausgelöst durch die IR-Struktur homologer Terminatorbereiche eine wahrscheinliche Ursache für die Transgeninaktivierung. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse der *pat45.1*- und *pat45.2*-Linien. Während die mit dem Pflanzentransformationsvektor pSW45-2 erzeugten *pat45.2* Linien nach Hitzestress stets stabil waren, zeigten viele sogar eine Zunahme, inaktivierten beinahe alle, mit dem Vektor pSW45-1 erzeugten *pat45.1*-Linien nach Hitzestress (Walter, 2001; diese Arbeit). Die *pat45.1*- und *pat45.2*-Linien unterschieden sich nur in der Orientierung des *pat45* Gens in der T-DNA der verwendeten Vektoren. Auf dem Vektor pSW45-1 ist das *pat* Gen in umgekehrter Orientierung zum *nptII* Gen vorhanden, das wie das *pat45* Gen unter der Kontrolle des CaMV35S Promotor und -Terminator steht. Dagegen liegt auf dem Vektor pSW45-2 das *pat45* Gen in der gleichen Orientierung wie das *nptII* Gen vor. Somit könnte auch hier die IR-Struktur homologer Terminatorsequenzen in den *pat45.1* Linien für das ‘Gene Silencing’ verantwortlich sein. Dass, im Gegensatz zu den *pat40*- bis *pat43* Linien, nicht alle *pat45.1* Linien eine Reduktion der Expression nach moderatem Hitzestress zeigen, könnte durch ein weniger häufiges ‘read-through’ des 3′*camv* im Vergleich zum 3′*nos* verursacht sein. Dies konnten Luo & Chen (2007) bereits für die GUS Expression unter Kontrolle des 35S Promotors zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 5′ UTR41 (*pat44*, *pat50*) allein zu keiner vollständigen Inaktivierung in allen untersuchten Linien unter Hitzestress führte. Von den *pat44*-Linien zeigten 21 %, von den *pat50* Linien 17 % eine Abnahme des Pat Proteins nach 10-tägiger Hitzestressbehandlung. Auch für den 3′*nos* allein (*pat46*) konnte nur für 28 % der T₀-Transformanten eine Reduktion des Pat Proteins unter Hitzestress nachgewiesen werden. Dies macht deutlich, dass keine der beiden Komponenten allein zu einem ‘Gene Silencing’ in allen Linien führt. Daher stellt sich die Frage, ob die temperaturinduzierte Inaktivierung der *pat* Expression einem gemeinsamen oder unterschiedlichen Mechanismen unterliegt.

In den *pat44*-, *pat50*- und *pat46* Linien gibt es keine IR-Struktur von homologen Sequenzen innerhalb der T-DNA. Dennoch könnten auch hier IR-Strukturen Auslöser für das ‘Gene Silencing’ in einigen Linien sein. Durch die unmittelbare Nähe der *pat44*- bis *pat50* Gene zur RB der T-DNA, und zur RB gerichtete Terminatorsequenzen, ist durch eine gemeinsame Integration mehrerer T-DNAs an einem Integrationsort auch hier die Bildung von IR-Strukturen homologer Terminatorsequenzen möglich. Die Southern Blot Analysen konnten diese Möglichkeit nicht völlig ausräumen. Sie zeigten im Gegensatz, dass die meisten der unter Hitzestress inaktivierenden Linien mehr als eine Kopie aufwiesen. Nach dieser Hypothese

hätten jedoch auch unter Hitzestress inaktivierende *pat45.2* Linien auftreten müssen, da auch hier eine unmittelbare Nähe zur RB und zur RB gerichtete Terminatorsequenzen vorhanden sind. Dies war nicht der Fall, was jedoch eventuell mit der deutlich geringeren Anzahl an untersuchten *pat45.2* Linien, die keine Integration von IR des Transgens aufweisen, erklärt werden könnte.

Einige unter Hitze inaktivierende *pat44* Linien wiesen nur eine Kopie auf. Die Reduktion der *pat* Expression aufgrund des Vorliegens von IR-Strukturen, wäre hier nur gegeben, wenn am Integrationsort zufällig zum Transgen homologe Sequenzen vorliegen. Dies erscheint jedoch nicht sehr wahrscheinlich.

Alternativ könnten am Integrationsort des *pat44* Gens zufällig Sequenzübereinstimmungen zum 3'nos bestehen, und durch das gemeinsame Vorliegen mit dem 5'UTR41 hitzestress-induzierte Repressorproteine binden. Wie häufig kurze homologe Sequenzen zum 3'nos im Tabakgenom vorkommen lässt sich nicht sagen. In Arabidopsis konnten mithilfe des TAIR-BLAST weniger als 15 kurze ähnliche Sequenzen gefunden werden. Vor diesem Hintergrund erscheint diese Hypothese ebenfalls nicht sehr wahrscheinlich.

Die hitzestressinduzierte Inaktivierung der *pat44* Linien mit einer Kopie könnte auch völlig unabhängig von der Transgensequenz selbst sein. Stattdessen könnten hier der Integrationsort unter Hitzestress inaktiviert werden. So besteht z. B. die Möglichkeit, dass der Integrationsort während der Stressbehandlung epigenetischen Modifikationen unterliegt, was zum TGS führt. TGS infolge erhöhter Temperatur und in Verbindung mit epigenetischen Modifikationen wurde bereits mehrfach diskutiert (Meyer et al. 1992; Walter et al., 1992; Conner et al., 1998; Meza et al., 2001). Es umfasst Histonmodifikationen und in einigen Fällen auch DNA-Methylierungen, wodurch zumeist reversible und in einigen Fällen vererbte Veränderungen der Genexpression hervorgerufen werden (Chinnusamy & Zhu, 2009). Weder das Methylierungsmuster des *pat* Transgens noch die Reversibilität der Hitzestressreaktion wurden hier überprüft, sodass epigenetische Modifikationen auch in Form der stabileren DNA-Methylierungen nicht ausgeschlossen werden können. Alternativ könnte es auch zur Integration des *pat* Gens in die Nähe eines endogenen Promotors gekommen sein, der bei Hitzestress induziert wird. Dadurch kann die reguläre Transkription gestört und aberrante RNAs produziert werden, die schließlich siRNA-abhängiges PTGS auslösen (English et al., 1996).

Für die temperaturvermittelte Inaktivierung der *pat* Expression könnten verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Keine der hier aufgestellten Hypothesen lässt sich belegen, sodass sich an dieser Stelle keine gesicherte Aussage zur Ursache treffen lässt.

D3.3 Warum wird die hitzeinduzierte Inaktivierung der *pat* Expression in der Pflanze nicht systemisch verbreitet?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein lokal applizierter Hitzestress in *pat41*- und *pat43* Pflanzen zu einer Transgeninaktivierung in ungestressten Pflanzenteilen führt. In ihrer Diplomarbeit konnte Sandra Kerbach (1999) an jeweils einer Linie zeigen, dass mit zunehmendem Abstand von einem hitzebehandelten Blatt die *pat* Expression in den darüberliegenden ungestressten Blättern zunimmt. Diese Ergebnisse konnte ich im Rahmen dieser Arbeit bestätigen. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Zunahme der *pat* Expressionslevel ausgehend von den unteren, älteren Blättern hin zu den oberen, jüngeren Blättern unabhängig von der Einwirkung eines Hitzestresses ist. Es handelt sich dabei vielmehr um ein allgemeines Phänomen der Expression unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors, die zu einer höheren Anreicherung des Transgenproduktes in jüngeren als in älteren Blättern führt (Williamson et al., 1989; van Leeuwen et al., 2001; Conley et al., 2010). Es zeigte sich, dass bei einem lokal applizierten Hitzestress, die Reduktion der *pat* Expression auf diesen Teil beschränkt bleibt, und keine systemische Vermittlung der hitzeinduzierten *pat* Inaktivierung über längere Strecken erfolgt.

Pflanzen sind sessile Organismen, die einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressoren ausgesetzt sind. Daher spielt der Informationsaustausch zwischen gestressten und ungestressten Pflanzenteilen zum Schutz der Pflanze eine wichtige Rolle. Die Pflanze bedient sich dazu einer Reihe von Signalstoffen, inklusive Phytohormone, Zucker und reaktive Sauerstoffspezies (Rolland et al., 2006; Bolouri-Moghaddam et al., 2010). Es ist auch ein pflanzlicher Abwehrmechanismus, der vermutlich ursprünglich dem Schutz der Ausbreitung eines Virusbefalls dient, der zu dem häufig beobachteten systemischen Silencing von Transgenen führt (Waterhouse et al., 2001). Aus diesen Gründen wäre ein systemisches Silencing der *pat* Transgenexpression auch hier zu erwarten gewesen.

Möglicherweise stellt die *pat* Expression für die Pflanze keinen mit einer Virusinfektion vergleichbaren Eingriff in ihre Lebensabläufe dar, weshalb die systemische Verbreitung der *pat* Inaktivierung ausbleibt. Dies könnte dadurch verursacht sein, dass in dem hitzestressenden Pflanzenteil der *pat41*- bzw. *pat43*-Pflanze das mobile Signal, welches das systemische Silencing vermittelt, nicht gebildet wird. Da das Silencing sequenzspezifisch ist, wird angenommen, dass RNAs an der Signalvermittlung beteiligt sind (Palauqui et al., 1997). Als Signalmoleküle werden siRNAs favorisiert (z. B. Klahre et al., 2002; Yoo et al., 2004), auch wenn der abschließende Beweis noch immer fehlt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass siRNAs in der Lage sind, sich über Zellgrenzen hinaus durch Plasmodesmen und über das Phloem innerhalb der Pflanze zu bewegen, und so systemisches Silencing zu

verursachen (Dunoyer et al., 2010). Dies könnte bedeuten, dass es in den *pat* Pflanzen nicht zur Bildung spezifischer mobiler siRNAs kommt.

Auch für die meisten endogenen Pflanzengene konnte keine Vermittlung des siRNA-abhängigen PTGS in der Pflanze beobachtet werden (Vaistij et al., 2002; Miki et al., 2005; Peterson & Albrechtsen, 2005; Shimamura et al., 2007). Ob und wie die Pflanze zwischen der Herkunft der siRNAs von einer endogenen mRNA und einer Virus-RNA unterscheidet, ist nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die systemische Ausbreitung von einer Amplifikation der siRNAs abhängig ist. Dabei dienen primäre siRNAs als Primer und die Ziel-mRNA als Matrize für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRPs) zur Bildung dsRNA, aus der sekundäre siRNAs generiert werden. Von diesen sekundären siRNAs wird vermutet, dass sie das Signal für das systemische Silencing darstellen (Himber et al., 2003; García-Peréz et al., 2004). Es ist möglich, dass endogene mRNAs - und auch die *pat* mRNA - durch die RdRP nicht als Matrize für die Produktion sekundärer siRNAs erkannt wird, und dass daher das Silencing nicht systemisch vermittelt wird.

D3.4 Warum verursacht die Kombination aus 5' UTRS und 3' *camv* stets eine Stabilität der *pat* Expression unter Hitzestress?

Stressbedingungen können epigenetische Modifikationen wie z. B. Histonmodifikationen (Chinnusamy & Zhu, 2009) verursachen, sodass es abhängig vom Integrationsort zum Silencing eines Transgens kommen kann. Daher erscheint es ungewöhnlich, dass der Integrationsort für die Stabilität der *pat*OCA- und *pat*45.2-Linien keine Rolle spielt. Die *pat*OCA-Linien weisen eine relative große Distanz des *pat* Gens zur RB auf, wodurch die Expression weniger von Einflüssen des Integrationsortes bestimmt wird. Bei den *pat*45.2-Linien befindet sich dagegen das *pat*45 Gen in direkter Nachbarschaft zur RB, sodass es überrascht, dass sich hier keine inaktivierenden Linien nach Hitzestress finden lassen. Dies könnte möglicherweise mit der geringen Anzahl an untersuchten Linien begründet werden, unter denen sich keine befindet, in der das *pat*45 Gen in eine für die Hitzestabilität ungünstige DNA-Umgebung integriert hat.

Alternativ könnte die gemeinsame Präsenz der 5' UTRS und des 3' *camv* eine Konversion in Heterochromatin verhindern, und den euchromatischen Zustand aufrecht erhalten oder sogar induzieren. Ein solcher Mechanismus konnte bereits für die sogenannten 'Matrix attachment region' (MARs) beschrieben werden. Dabei handelt es sich um Gen-flankierende DNA Sequenzen, die an der Verankerung der DNA an der Kernmatrix beteiligt sind, und so die Aufrechterhaltung von unabhängigen, euchromatischen Regionen oder Interaktionen der DNA

mit aktivierenden Komplexen begünstigen (Holmes-Davis & Comai, 1998). Infolgedessen werden MARs häufig mit einer höheren Expression und limitierten Positionseffekten in Verbindung gebracht (Breyne et al., 1992b). MARs sind AT-reich, und mehrere Einheiten arbeiten synergistisch zusammen, um eine effiziente Bindung zur Matrix zu ermöglichen (Bode et al., 1996). Der 3' *camv* ist ebenfalls AT-reich, und für die Stabilisierung der Expression ist die Interaktion mit der 5' UTRS notwendig. Ob beide Regionen funktionell mit MARs vergleichbar sind, steht noch zu überprüfen.

Die Stabilität der *pat* Expression beruht vermutlich darauf, dass sie nicht vom Integrationsort beeinflusst wird. Dies könnte eventuell dadurch erreicht werden, dass die Kombination aus der 5' UTRS und dem 3' *camv* den Zustand einer transkriptionell aktiven Region unter Hitzestress aufrechterhält.

D3.5 Warum verursacht die 5' UTRS unter Hitzestress häufig eine Zunahme der *pat* Expression?

Während in Verbindung mit der 5' UTR41 keine Zunahme der *pat* Expression auftrat, war die 5' UTRS in beinahe $\frac{3}{4}$ aller *pat*OCA- und *pat*45.2 Linien mit einer Zunahme der *pat* mRNA- und Protein 'steady state level' assoziiert. Auch in einigen *pat*46- und *pat*49 Linien, die den 3' *nos* bzw. 3' *ocs* beinhalten, war eine Zunahme zu detektieren, sodass diese unabhängig von Sequenzunterschieden stromabwärts des Kodierbereichs ist. Die stärkste Zunahme konnte in den *pat*45.2 Linien nachgewiesen werden.

Die Zunahme war bereits im mRNA 'steady state level' zu detektieren und beruht demnach auf einer erhöhten Transkriptionsrate oder mRNA Stabilität. Gallie et al. (1995) konnten zeigen, dass unter Hitzeschock eine erhöhte mRNA Stabilität die Zunahme der *LUC*Reporter mRNA hervorruft. Eine erhöhte Stabilität der *pat*45 mRNA aufgrund von Hitzestress konnte ich in einem Experiment zur mRNA-Halbwertszeit jedoch nicht detektieren.

Auch eine gesteigerte Transkriptionsrate könnte für die Zunahme der *pat* mRNA 'steady state level' verantwortlich sein. Im Rahmen der Hitzeschockantwort kommt es z. B. zur Induktion der Transkription von Hitzeschockgenen (Lindquist, 1986), für die konservierte Promotorelemente (HSEs) verantwortlich sind. Diese sind stromaufwärts der TATA-Box lokalisiert und werden von *in trans* agierenden Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren erkannt (Scharf et al., 1998). Es gibt bislang jedoch weder einen Hinweis, dass HSE-Sequenzen stromabwärts der TATA-Box die Transkription fördern, noch verfügt die 5' UTRS über Sequenzhomologien zu diesen Elementen.

Auch Modifikationen in den mRNA Sekundärstrukturen könnten zu erhöhten Transkriptionsraten führen. Sekundärstrukturen sind von vielen Faktoren beeinflusst, zu denen u. a. die Temperatur gehört (Shabalina et al., 2006). So könnte der Hitzestress zur Auflösung von Haarnadelstrukturen ('stem-loop') führen, die die Transkriptionselongation beeinträchtigen (Curie & McCormick, 1997). Lediglich für die *pat45* mRNA wurde mit dem Programm Mfold (Zuker, 2003) eine abweichende Sekundärstruktur berechnet. Sie unterscheidet sich von denen der *pat44*-, *pat47*- und *patOCA* mRNA durch das Fehlen einer kleinen 'stem-loop' Struktur in der 5' UTR (Abb. D2), wodurch eventuell die Transkription gefördert wird. Zudem ist hier das Translationsstartcodon AUG innerhalb der Schleife einer 'stem-loop' Struktur lokalisiert, was eventuell dessen Erkennung durch das Ribosom fördert. Tatsächlich zeichnen sich die *pat45.2* Linien durch eine stärkere Zunahme unter Hitzestress aus, als es für *patOCA* Linien detektiert werden konnte.

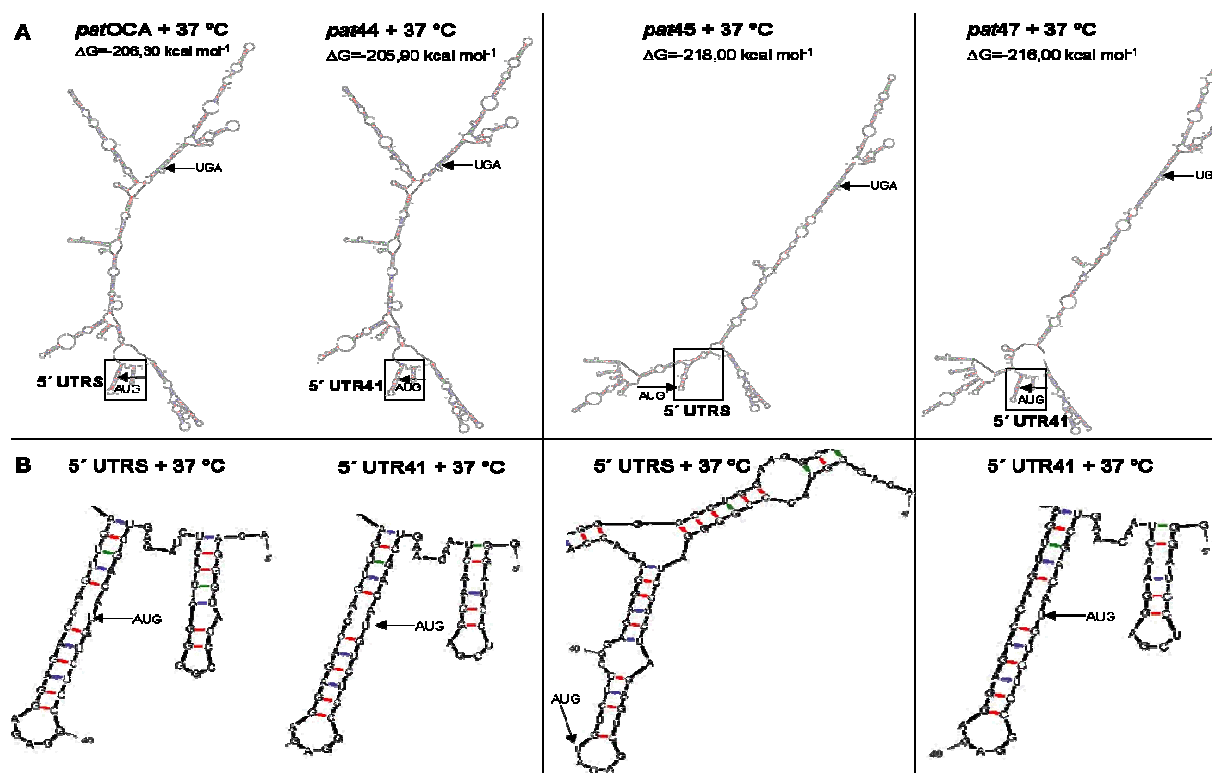


Abb. D2: Potentielle mRNA-Sekundärstrukturen für die *patOCA*-, *pat44*-, *pat45*- und *pat47* mRNA bei 37 °C.

A) Potentielle Sekundärstrukturen der gesamten *patOCA*-, *pat44*-, *pat45*- und *pat47* mRNA von Position +1 bis zur Major CS des 3' *camy* bei 37 °C berechnet mit Mfold (Zuker, 2003).

B) Ausschnitt der RNA-Sekundärstruktur im Bereich der 5' UTR.

Die *patOCA* mRNA (5' UTRS) weist dagegen keine auffälligen Unterschiede zur Sekundärstruktur der *pat44* mRNA (5' UTR41) auf, die die verschiedenen Transkriptionsraten unter Hitzestress erklären würden. Wie bereits erwähnt, ist es jedoch ungewiss, ob die berechneten

mRNA Sekundärstrukturen auch *in vivo* gebildet werden. Daher bleibt unklar, ob die Sekundärstruktur der 5' UTRS zumindest in den *pat45.2* Linien zu den erhöhten mRNA 'steady state level' beiträgt.

Alternativ könnte die leichte Hitzeschockantwort auch zu einer reduzierten Abundanz eines in *trans* agierenden Repressorproteins geführt haben, das bei normaler Temperatur die Transkriptionsrate herabsetzt. Die Hitzeschockantwort ist durch die Repression der Translation der für die Stressantwort nicht benötigten Gene gekennzeichnet (Lindquist, 1986). So werden die meisten Haushaltsgene unter Hitzeschock nicht mehr translatiert, sondern ihre mRNAs in sogenannten 'Heat Shock Granules' gespeichert (Nover et al., 1989; Anderson & Kedersha, 2002). Dies könnte dazu geführt haben, dass ein Repressorprotein, das unter normalen Bedingungen durch Bindung an der 5' UTRS die *pat* Expression kontrolliert, unter Hitzestressbedingungen stark reduziert ist.

Als Ursache für die gesteigerten mRNA 'steady state level' in Verbindung mit der 5' UTRS unter Hitzestress kommen verschiedene Mechanismen in Frage, von denen jedoch anhand der vorliegenden Daten keine belegt werden kann.

D4 Wie ist die *pat* Expression in anderen Kulturarten reguliert?

Im Allgemeinen konnte ich für die transgenen Albatros-Kartoffel Events einen mit Tabak vergleichbaren Einfluss der unterschiedlichen 5'- und 3' Bereiche auf die Expression unter Kontrollbedingungen ermitteln. Obwohl die Kombination aus 5' UTRS, 3' UTRS und 3'*camv* (*patOCA*) auch in Kartoffel zur stärksten Expression führte, war das Expressionslevel um den Faktor 7 geringer als das durchschnittliche Expressionslevel in Tabak. Leider stand für die Ermittlung der *patOCA* Expression nur ein Event zur Verfügung. Es ist nicht auszuschließen, dass in diesem Event mit einer *pat* Kopie das Expressionsniveau durch einen ungünstigen Integrationsort beeinträchtigt wird. So bleibt offen, ob durch eine höhere Anzahl an *patOCA* Events das Expressionslevel sich dem in Tabak annähern könnte.

Ein weiterer Unterschied zum Tabak scheint in der Umsatzrate der *pat40*- und *pat41* mRNA in das Pat Protein zu bestehen. Trotz vergleichbarer mRNA 'steady state level' in Tabak und Kartoffel konnte in den *pat40* Events ca. zweimal weniger, im *pat41* Event sogar ca. viermal weniger Pat Protein detektiert werden als in Tabak. Der Vergleich des GC-Gehaltes und Codongebrauchs endogener Tabak- und Kartoffelgene ergab hohe Übereinstimmungen (siehe Tab. 11 und Anhang F2), sodass vor diesem Hintergrund die Unterschiede in den Effizienzen der Translation nicht zu erklären sind.

Der Austausch der 5' UTRS und 3' UTRS durch die 5' UTR41 (*pat44*) bzw. 3' UTR41 (*pat45*) führte in Kartoffel zu einer vergleichbaren Reduktion der Expression bei 24 °C wie in Tabak. Somit scheinen diese Regionen in beiden *Solanaceen* einen vergleichbaren Einfluss auf das Expressionsniveau auszuüben.

Auch unter Hitzestressbedingungen war zwischen Tabak und Kartoffel eine sehr ähnliche Regulation zu beobachten. Lediglich bei *pat44* schienen prozentual mehr *pat44* Events als in Tabak, jedoch ebenfalls nicht alle Events, von einer Reduktion der mRNA- und Protein 'steady state level' betroffen zu sein. Aufgrund der geringeren Individuenanzahl müsste dieses Ergebnis noch verifiziert werden. Zu diesem Zeitpunkt jedoch scheint in Kartoffel die 5' UTR41 im *pat44* Gen eine höhere Instabilität zu verursachen als in Tabak. Möglicherweise führte der Hitzestress von 37 °C in Kartoffel zur Auslösung einer stärkeren Hitzeschockantwort als in Tabak. So war zu beobachten, dass in einigen Hitzestress-Experimenten einige der Kartoffelevents den 10 Tage andauernden Hitzestress nicht überlebten, ein Phänomen, das für einen lang anhaltenden Hitzeschock häufig beobachtet wurde (Überblick in Lindquist, 1986). Eine stärkere Hitzeschockantwort verursacht vermutlich auch eine stärkere Repression der Expression der für die Stressantwort nicht benötigten Gene (Lindquist, 1986), zu denen das die 5' UTR41 enthaltende *pat44* Gen gehört. Dagegen führte im Gegensatz zur 5' UTR41 die 5' UTRS auch in Kartoffel zu einer bevorzugten Expression unter Hitzestress.

Wie in Tabak war die *pat* Expression in allen Kartoffelevents, die eine Kombination aus 5' UTRS und 3' *camv* aufwiesen (*patOCA*, *pat45.2*), stabil nach Hitzestress, zeigten häufig sogar ebenfalls eine Zunahme. Dagegen war in allen *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Events eine Inaktivierung der *pat* Expression unter Hitzestress zu detektieren, ebenfalls bereits auf mRNA Ebene. Hier wirken mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselben Regulationsmechanismen wie in Tabak, deren genauere Charakterisierung jedoch noch erfolgen muss.

Auch hinsichtlich der Inter-Transformant-Variabilitäten gibt es zwischen Tabak und Kartoffel hohe Übereinstimmungen. So zeichnen sich *pat40*- und *pat43* Transformanten wie in Tabak durch relativ geringe (< 2,4-fach), die *pat44*- und *pat45* Transformanten durch hohe Expressionsunterschiede (12- bis 68-fach) aus. Die hohe Übereinstimmung der *pat* Expression in Tabak und Kartoffel ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sie allgemeinen Regulationsmechanismen in *Solanaceen*, möglicherweise in Pflanzen generell unterliegt.

D5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich nachweisen, dass die Kombination aus 5' UTRS, 3'*camv* und 3' UTRS im *patOCA* Gen zur höchsten *pat* Expression führt. Ich konnte jedoch auch die Tendenz zeigen, dass je kürzer die 3' UTR ist, desto höher sind die Pat Protein 'steady state level'. Es wäre interessant herauszufinden, ob ein neues *pat* Gen, bestehend aus 5' UTRS, 3'*camv* ohne eine zusätzlich in den 5' Bereich der 3' UTR eingebrachte Sequenz die *pat* Expression noch einmal über die Werte steigern könnte, die für die *patOCA* Linien gemessen werden konnten. Auch eine Kombination aus der für die Transkription förderlichen 5' UTRS mit der für die Translation günstigeren 5' UTR41 könnte sich eventuell positiv auf das Expressionslevel auswirken.

Die Kombination aus 5' UTRS und 3'*camv* scheint die *pat* Expression unter Hitzestress zu stabilisieren. Für die Stabilisierung spielt die Struktur der T-DNA in den Pflanzentransformationsvektoren vermutlich keine Rolle, da sich der pOCA/Ac und pSW45-2 deutlich unterscheiden, beispielsweise in der Entfernung des *pat* Gens zur RB. Ob die Kombination beider Sequenzen generell zur Stabilisierung der Transgenexpression führt, könnte durch eine Kombination mit einem anderen Kodierbereich untersucht werden.

Die hitzeinduzierte Geninaktivierung in allen untersuchten *pat40*-, *pat41*- und *pat43* Linien ist dagegen vermutlich auf die Struktur der T-DNA in den entsprechenden Pflanzentransformationsvektoren zurückzuführen. Die Vermutung, dass die IR-Struktur des 3'*nos* dafür verantwortlich ist, könnte beispielsweise durch das Einbringen eines dieser drei *pat*Gene in den Pflanzentransformationsvektor pLH9000 (Hausmann & Töpfer, 1999) untersucht werden. Hier gäbe es keine IR-Struktur von homologen Terminatorsequenzen, da im pLH9000 die Transkription des *nptII* Gen durch den 3'*camv* terminiert wird. Käme es dennoch zu einer hitzeinduzierten Inaktivierung in allen resultierenden Transformanten, könnte eine Beteiligung von IR-Strukturen als Ursache ausgeschlossen werden.

Die Vermutung, dass siRNAs am hitzeinduzierten 'Gene Silencing' beteiligt sind, indem ihre Produktion durch die erhöhten Temperaturen ansteigt, könnte z. B. mit der Analyse der Transgenexpression unter tieferen Temperaturen z. B. bei 15 °C analysiert werden. Zeigt sich hier eine Steigerung der Expression im Vergleich zur Kultivierung bei 24 °C, so wäre dies ein guter Hinweis für die Richtigkeit der Vermutung. Der Nachweis von spezifischen siRNAs könnte eventuell mithilfe einer Sonde, die über den gesamten Terminatorbereich reicht, sowie durch eine Erhöhung der Sensitivität z. B. durch Radioaktivmarkierung der Sonde gelingen. Alternativ könnten real-time PCR basierte Methoden zum Nachweis der siRNAs eingesetzt werden.

E Literaturverzeichnis

- Amrolia, P., Cunningham, J., Ney, P., Nienhuis, A., Jane, S.** (1995) Identification of two novel regulatory elements within the 5'-untranslated region of the human γ -globin gene. *J Biol Chem* **270**:12892-12898.
- Anderson, P. and Kedersha, N.** (2002) Stressful initiations. *J Cell Sci* **115**:3227-3234.
- Bailey-Serres, J.** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci* **4**:142-148.
- Banerjee, A., Lin, T., Hannapel, D.** (2009) Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol* **151**:1831-1843.
- Batard, Y., Hehn, A., Nedelkina, S., Schalk, M., Pallett, K., Schaller, H., Werck-Reichhart, D.** (2000) Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems. *Arch Biochem Biophys* **379**:161-169.
- Bayer, E., Zahner, H., König, W., Jessipow, S., Gugel, K., Hagele, K., Hagenmaier, H.** (1972) Metabolites of Microorganisms 98. Phosphinothricin and Phosphinothricyl-Alanylalanine. *Helv Chim Acta* **55**:224-239.
- Beilharz, T. and Preiss, T.** (2007) Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome. *RNA* **13**:982-997.
- Bevan, M., Barnes, W. M., and Chilton, M. D.** (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res* **11**:369-385.
- Bhat, S., Tang, L., Krueger, A., Smith, C., Ford, S., Dickey, L., Petracek, M.** (2004) The Fed-1 (CAUU)(4) element is a 5' UTR dark-responsive mRNA instability element that functions independently of dark-induced polyribosome dissociation. *Plant Mol Biol* **56**:761-773.
- Bode, J., Stengert-Iber, M., Kay, V., Schlake, T., Dietz-Pfeilstetter, A.** (1996) Scaffold/matrix-attached regions: Topological switches with multiple regulatory functions. *Crit Rev Eukar Gene* **6**:115-138.
- Bolle, C., Sopory, S., Lubberstedt, T., Herrmann, R., Oelmüller, R.** (1994) Segments encoding 5'-untranslated leaders of genes for thylakoid proteins contain *cis*-elements essential for transcription. *Plant J* **6**:513-523.
- Bolouri-Moghaddam, M., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., van den Ende, W.** (2010) Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *Febs J* **277**:2022-2037.
- Bradford, M.** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Breyne, P., Gheysen, G., Jacobs, A., Van Montagu, M., Depicker, A.** (1992) Effect of T-DNA configuration on transgene expression. *Mol Gen Genet* **235**:389-396.
- Breyne, P., Van Montagu, M., Depicker, A., Gheysen, G.** (1992b) Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *Plant Cell* **4**:463-471.
- Brinker, M., Klaff, P., Wissel, K., Kellmann, J., Piechulla, B.** (2001) Distinct Lhc mRNA stabilities in several vascular plant species. *J Plant Physiol* **158**:1479-1485.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y., Sieburth, L., Voinnet, O.** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**:1185-1190.
- Broer, I.** (1989) Expression des Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase-Gens aus *Streptomyces viridochromogenes* in *Nicotiana tabacum*. Dissertation
- Buhtz, A., Pieritz, J., Springer, F., Kehr, J.** (2010) Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *Bmc Plant Biol* **10**:64

- Caspar, T. and Quail, P.** (1993) Promoter and leader regions involved in the expression of the *Arabidopsis* ferredoxin-A gene. *Plant J* **3**:161-174.
- Chen, Z., Pan, N., Beachy, R.** (1988) A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promoter. *Embo J* **7**:297-302.
- Chinnusamy, V. and Zhu, J.** (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**:133-139.
- Chung, S., Frankman, E., Tzfira, T.** (2005) A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci* **10**:357-361.
- Collados, R., Andreu, V., Picorel, R., Alfonso, M.** (2006) A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of omega 3 fatty-acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions. *Febs Lett* **580**:4934-4940.
- Conley, A., Jevnikar, A., Menassa, R., Brandle, J.** (2010) Temporal and spatial distribution of erythropoietin in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res* **19**:291-298.
- Conner, A., Mlynarova, L., Stiekema, W., Nap, J.** (1998) Meiotic stability of transgene expression is unaffected by flanking matrix-associated regions. *Mol Breeding* **4**:47-58.
- Curie, C. and McCormick, S.** (1997) A strong inhibitor of gene expression in the 5' untranslated region of the pollen-specific LAT59 gene of tomato. *Plant Cell* **9**:2025-2036.
- Day, C., Lee, E., Kobayashi, T., Holappa, L., Albert, H., Ow, D.** (2000) Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev* **14**:2869-2880.
- De Buck, S., Windels, P., De Loose, M., Depicker, A.** (2004) Single-copy T-DNAs integrated at different positions in the *Arabidopsis* genome display uniform and comparable beta-glucuronidase accumulation levels. *Cell Mol Life Sci* **61**:2632-2645.
- De Greve, H., Leemans, J., Hernalsteens, J., Thiatoong, L., Debeuckeleer, M., Willmitzer, L., Otten, L., Van Montagu, M., Schell, J.** (1982) Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase from tobacco crown galls after deletion of tumor controlling functions. *Nature* **300**:752-754.
- Dean, C., Favreau, M., Tamaki, S., Bondnutter, D., Dunsmuir, P., Bedbrook, J.** (1988) Expression of tandem gene fusions in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* **16**:7601-7617.
- Dean, C., Favreau, M., Bondnutter, D., Bedbrook, J., Dunsmuir, P.** (1989) Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia *Rbcs* genes. *Plant Cell* **1**:201-208.
- Defoiche, J., Zhang, Y., Lagneaux, L., Pettengell, R., Hegedus, A., Willems, L., Macallan, D.** (2009) Measurement of ribosomal RNA turnover in vivo by use of deuterium-labeled glucose. *Clin Chem* **55**:1824-1833.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.** (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* **1**:561-573.
- Dixon, R.** (1985) Plant cell culture - a practical approach. IRL Press, Oxford.
- Dröge, W., Broer, I., Pühler, A.** (1992) Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* **187**:142-151.
- Dunoyer, P., Brosnan, C., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C., Voinnet, O.** (2010) An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *Embo J* **29**:1699-1712.
- Eberle, A., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R., Muhlemann, O.** (2008) Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *Plos Biol* **6**:849-859.
- Eckes, P., Vijtewaal, B., Donn, G.** (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-Phosphinothricin in plants. *J. Cell Biochem Suppl.* **13 D**: 334.
- Elmayan, T. and Vaucheret, H.** (1996) Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J* **9**:787-797.
- Elomaa, P., Helariutta, Y., Griesbach, R., Kotilainen, M., Seppanen, P., Teeri, T.** (1995) Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol Gen Genet* **248**:649-656.

- English, J., Mueller, E., Baulcombe, D.** (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**:179-188.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., Izaurralde, E.** (2007) Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* **21**:2558-2570.
- Fagard, M. and Vaucheret, H.** (2000) (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **51**:167-194.
- Filipecki, M. and Malepszy, S.** (2006) Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J Appl Genet* **47**:277-286.
- Fischer, R. and Schillberg, S.** (2004) Molecular farming: plant-made pharmaceuticals and technical proteins. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fortier, E. and Belote, J.** (2000) Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* **26**:240-244.
- Fulneček, J.** (2007) Isolation and detection of small RNA molecules. *Plant Soil Environ* **53**:451-455.
- Gallie, D., Feder, J., Schimke, R., Walbot, V.** (1991) Posttranscriptional regulation in higher eukaryotes - the role of the reporter gene in controlling expression. *Mol Gen Genet* **228**:258-264.
- Gallie, D., Caldwell, C., Pitto, L.** (1995) Heat-shock disrupts cap and poly(A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reporter mRNA. *Plant Physiol* **108**:1703-1713.
- Gallie, D.** (2002) The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res* **30**:3401-3411.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**:151.
- García-Peréz, R., Van Houdt, H., Depicker, A.** (2004) Spreading of post-transcriptional gene silencing along the target gene promotes systemic silencing. *Plant J* **38**:594-602.
- Gardner, R., Howarth, A., Hahn, P., Brownluedi, M., Shepherd, R., Messing, J.** (1981) The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M₁₃mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acids Res* **9**:2871-2888.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V., Timko, M., Scolnik, P., Cashmore, A.** (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *PNAS* **85**:7089-7093.
- Grant, S.** (1999) Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell* **96**:303-306.
- Gray, N. and Hentze, M.** (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *Embo J* **13**:3882-3891.
- Gray, N., Collier, J., Dickson, K., Wickens, M.** (2000) Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. *Embo J* **19**:4723-4733.
- Greenberg, M. and Belasco, J.** (1993) Control of the decay of labile protooncogene and cytokine mRNAs. In: *Control of Messenger RNA Stability*. Academic Press. 199-218.
- Guerineau, F., Brooks, L., Mullineaux, P.** (1991) Effect of deletions in the cauliflower mosaic virus polyadenylation sequence on the choice of the polyadenylation sites in tobacco protoplasts. *Mol Gen Genet* **226**:141-144.
- Guo, H., Xie, Q., Fei, J., Chua, N.** (2005) MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell* **17**:1376-1386.
- Gültekin, H. and Heermann, K.** (1988) The use of polyvinylidene difluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* **172**:320-329.
- Haffani, Y., Overney, S., Yelle, S., Bellemare, G., Belzile, F.** (2000) Premature polyadenylation contributes to the poor expression of the *Bacillus thuringiensis* cry3Ca1 gene in transgenic potato plants. *Mol Gen Genet* **264**:82-88.

- Hamilton, A. and Baulcombe, D.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**:950-952.
- Hausmann, L. and Töpfer, R.** (1999) Entwicklung von Plasmid-Vektoren. In *BioEngineering für Rapsorten nach Maß, Vorträge für Pflanzenzüchtung*, 45:153-171.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O.** (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J.* **22**:4523-4533.
- Hobbs, S., Kpodar, P., DeLong, C.** (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol* **15**:851-864.
- Hobbs, S., Warkentin, T., DeLong, C.** (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Biol* **21**:17-26.
- Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schilperoort, R.** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**:179-180.
- Holmes-Davis, R. and Comai, L.** (2002) The matrix attachment regions (MARs) associated with the Heat Shock Cognate 80 gene (HSC80) of tomato represent specific regulatory elements. *Mol Genet Genom* **266**:891-898.
- Horsch, R., Fry, J., Hoffmann, N., Eichholtz, D., Rogers, S., Fraley, R.** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**:1229-1231.
- Hunt, A.** (1994) mRNA 3' end formation in plants. *Annu Rev Plant Phys* **45**:47-60.
- Ingelbrecht, I., Herman, L., Dekeyser, R., Van Montagu, M., Depicker, A.** (1989) Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell* **1**:671-680.
- Ingelbrecht, I., Breyne, P., Vancompernelle, K., Jacobs, A., Van Montagu, M., Depicker, A.** (1991) Transcriptional interference in transgenic plants. *Gene* **109**:239-242.
- Jin, G., Davey, M., Ertl, J., Chen, R., Yu, Z., Daniel, S., Becker, W., Chen, C.** (1998) Interaction of DNA-binding proteins with the 5' -flanking region of a cytokinin-responsive cucumber hydroxypyruvate reductase gene. *Plant Mol Biol* **38**:713-723.
- Jobling, S. and Gehrke, L.** (1987) Enhanced translation of chimeric messenger-RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* **325**:622-625.
- Jones, J., Dunsmuir, P., Bedbrook, J.** (1985) High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *Embo J* **4**:2411-2418.
- Jones, J., Gilbert, D., Grady, K., Jorgensen, R.** (1987) T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol Gen Genet* **207**:478-485.
- Jorgensen, R., Cluster, P., English, J., Que, Q., Napoli, C.** (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* **31**:957-973.
- Joshi, C.** (1987) Putative Polyadenylation Signals in Nuclear Genes of Higher-Plants - A Compilation and Analysis. *Nucleic Acids Res* **15**:9627-9640.
- Kameda, T., Ikegami, K., Liu, Y., Terada, K., Sugiyama, T.** (2004) A hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi. *Biochem Biophys Res Commun* **315**:599-602.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J.** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol* **5**:460-465.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fitzler, M., Scheuner, D., Kaufman, R., Golan, D., Anderson, P.** (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **169**:871-884.
- Kerbach, S.** (1999) Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung - Sequenzen und Signale. Diplomarbeit
- Kertesz, S., Kerenyi, Z., Merai, Z., Bartos, I., Palfy, T., Barta, E., Silhavy, D.** (2006) Both introns and long 3' -UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Res* **34**:6147-6157.

- Ketting, R., Haverkamp, T., van Luenen, H., Plasterk, R.** (1999) mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**:133-141.
- Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M., Kumar, S.** (1999) Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol Biol Rep* **17**:74.
- Klauff, P. and Gruissem, W.** (1991) Changes in Chloroplast mRNA Stability during Leaf Development. *Plant Cell* **3**:517-529.
- Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S., Iglesias, V., Meins, F.** (2002) High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *PNAS* **99**:11981-11986.
- Kochetov, A., Sirnik, O., Rogosin, I., Glazko, G., Komarova, M., Shumny, V.** (2002) Contextual features of higher plant mRNA 5'-untranslated regions. *Mol Biol* **36**:510-516.
- Köcher, H.** (1983) Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide Hoe 39866. *Aspects Appl Biol* **4**: 227-234.
- Köhne, S., Neumann, K., Pühler, A., Broer, I.** (1998) The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. *J Plant Physiol* **153**:631-642.
- Kondo, Y., Shomura, T., Ogawa, Y., Tsuruoka, T., Watanabe, H., Totsukawa, K., Suzuki, T., Moriyama, C., Yoshida, J., Inouye, S., Niida, T.** (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substances. *Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha* **13**: 34-41.
- Kooter, J., Matzke, M., Meyer, P.** (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci* **4**:340-347.
- Kozak, M.** (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**:5134-5142.
- Kozak, M.** (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *PNAS* **87**:8301-8305.
- Kozak, M.** (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**:19867-19870.
- Kozak, M.** (2005) Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**:13-37.
- Kozziel, M., Carozzi, N., Desai, N.** (1996) Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol* **32**:393-405.
- Kriete, G.** (1995) Selektive Abtötung pflanzlicher Gewebe durch Deacetylierung von N-Acetyl-Phosphinothricin: Induzierbare männliche Sterilität in transgenen Tabakpflanzen. Dissertation.
- Laemmli, U.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Latzkow, T.** (2011) Identifizierung eines pflanzlichen Genregulationsmechanismus unter sublethalen Temperaturbedingungen. Dissertation.
- Lindquist, S.** (1986) The Heat-Shock Response. *Annu Rev Biochem* **55**:1151-1191.
- Linsmaier, E. and Skoog, F.** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* **18**:100.
- Liu, J., Blancaflor, E., Nelson, R.** (2005) The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* **138**:1853-1865.
- Livak, K. and Schmittgen, T.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**:402-408.
- Lucas, W., Yoo, B., Kragler, F.** (2001) RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews Mol Cell Biol* **2**:849-857.

- Luo, Z. and Chen, Z.** (2007) Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:943-958.
- Lutz, C. and Moreira, A.** (2011) Alternative mRNA polyadenylation in eukaryotes: an effective regulator of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2**:22-31.
- MacDonald, M., Mogen, B., Hunt, A.** (1991) Characterization of the polyadenylation signal from the T-DNA-encoded octopine synthase gene. *Nucleic Acids Res* **19**:5575-5581.
- Maliga, P., Sz.-Brennovits, A., Márton, L.** (1973) Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature-New Biol* **244**:29-30.
- Manderscheid, R. and Wild, A.** (1986) Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine-synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. *J Plant Physiol* **123**:135-142.
- Mason, H., Haq, T., Clements, J., Arntzen, C.** (1998) Edible vaccine protects mice against *E.coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic *LT-B* gene. *Vaccine* **16**:1336-1343.
- Matzke, A. and Matzke, M.** (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* **1**:142-148.
- Matzke, M. and Matzke, A.** (1993) Genomic imprinting in plants - parental effects and trans-inactivation phenomena. *Annu Rev Plant Phys.* **44**:53-76.
- Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer, H., Niedenhof, I., Saedler, H.** (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize *Al* gene construct in transgenic Petunia and its color phenotype. *Mol Gen Genet* **231**:345-352.
- Meyer, P., Heidmann, I., Niedenhof, I.** (1993) Differences in DNA methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic Petunia. *Plant J* **4**:89-100.
- Meyers, B., Vu, T., Tej, S., Ghazal, H., Matvienko, M., Agrawal, V., Ning, J., Haudenschild, C.** (2004) Analysis of the transcriptional complexity of Arabidopsis thaliana by massively parallel signature sequencing. *Nat Biotechnol* **22**:1006-1011.
- Meza, T., Kamfjord, D., Hakelien, A., Evans, I., Godager, L., Mandal, A., Jakobsen, K., Aalen, R.** (2001) The frequency of silencing in Arabidopsis thaliana varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Res.* **10**:53-67.
- Miki, D., Itoh, R., Shimamoto, K.** (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* **138**:1903-1913.
- Mikschofsky, H.; Hartmann, A.; Janczyk, P.; Keil, G.; König, P.; Schirrmeier, H.; Hammer, M.; Junghans, H.; Schmidt, K.; Schmidtke, J.; Souffrant, W.; Schwerin, M.; Broer, I.** (2011) Expression of the viral antigen VP60 in transgenic potatoes and its effect on the nutritional composition of tubers. *FNS* **2**:74-86
- Miller, J.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Mitsuhara, I. et al.** (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* **37**:49-59.
- Mogen, B., MacDonald, M., Graybosch, R., Hunt, A.** (1990) Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient mRNA 3'-end formation in plants. *Plant Cell* **2**:1261-1272.
- Morino, K., Olsen, O., Shimamoto, K.** (1999) Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *Plant J* **17**:275-285.
- Muhlrad, D. and Parker, R.** (1999) Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* **5**:1299-1307.
- Mullis, K. and Faloona, F.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, 335-350.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* **15**:473-497.
- Murray, E., Lotzer, J., Eberle, M.** (1989) Codon usage in plant genes. *Nucl Acids Res* **17**:477-498.
- Muskens, M., Vissers, A., Mol, J., Kooter, J.** (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* **43**:243-260.
- Nagaya, S., Kawamura, K., Shinmyo, A., Kato, K.** (2010) The HSP terminator of Arabidopsis thaliana increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol* **51**:328-332.

- Nagy, F., Boutry, M., Hsu, M., Wong, M., Chua, N.** (1987) The 5'-proximal region of the wheat Cab-1 gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response. *EMBO J* **6**:2537-2542.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R.** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* **2**:279-289.
- Narsai, R., Howell, K., Millar, A., O'Toole, N., Small, I., Whelan, J.** (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**:3418-3436.
- Nausch, H.** (2007) Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung – Bedeutung des *ocs*-Terminators & Untersuchung zum Signaltransfer. Diplomarbeit.
- Neumann, K., Dröge-Laser, W., Köhne, S., Broer, I.** (1997) Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiol* **115**:939-947.
- Newman, T., OhmeTakagi, M., Taylor, C., Green, P.** (1993) DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant Cell* **5**:701-714.
- Nicholson, S. and Srivastava, V.** (2009) Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genom* **282**:319-328.
- Nover, L., Scharf, K., Neumann, D.** (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**:1298-1308.
- Odell, J., Nagy, F., Chua, N.** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**:810-812.
- Ohme-Takagi, M., Taylor, C., Newman, T., Green, P.** (1993) The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *PNAS* **90**:11811-11815.
- Oka, S., Midorikawa, K., Kodama, H.** (2010) Cosuppression and RNAi induced by *Arabidopsis* ortholog gene sequences in tobacco. *Plant Biotechnol Rep* **4**:185-192.
- Palauqui, J. and Vaucheret, H.** (1995) Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression - a comparative study of 38 combinations of transgene loci. *Plant Mol Biol* **29**:149-159.
- Palauqui, J., Elmayan, T., Pollien, J., Vaucheret, H.** (1997) Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J* **16**:4738-4745.
- Pant, B., Buhtz, A., Kehr, J., Scheible, W.** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* **53**:731-738.
- Pappu, S., Brand, R., Pappu, H., Rybicki, E., Gough, K., Frenkel, M., Niblett, C.** (1993) A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes - Application to Dasheen mosaic virus. *J Virol Meth* **41**:9-20.
- Paraskeva, E., Gray, N., Schlager, B., Wehr, K., Hentze, M.** (1999) Ribosomal pausing and scanning arrest as mechanisms of translational regulation from cap-distal iron-responsive elements. *Mol Cell Biol* **19**:807-816.
- Park, Y., Papp, I., Moscone, E., Iglesias, V., Vaucheret, H., Matzke, A., Matzke, M.** (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J* **9**:183-194.
- Pauli, S., Rothnie, H., Gang, C., He, X., Hohn, T.** (2004) The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *J Virol* **78**:12120-12128.
- Peach, C. and Velten, J.** (1991) Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* **17**:49-60.
- Perlak, F., Fuchs, R., Dean, D., McPherson, S., Fischhoff, D.** (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *PNAS* **88**:3324-3328.
- Pesole, G., Liuni, S., Grillo, G., Licciulli, F., Mignone, F., Gissi, C., Saccone, C.** (2002) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic Acids Res* **30**:335-340.
- Petersen, B. and Albrechtsen, M.** (2005) Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants. *Plant Mol Biol* **58**:575-583.

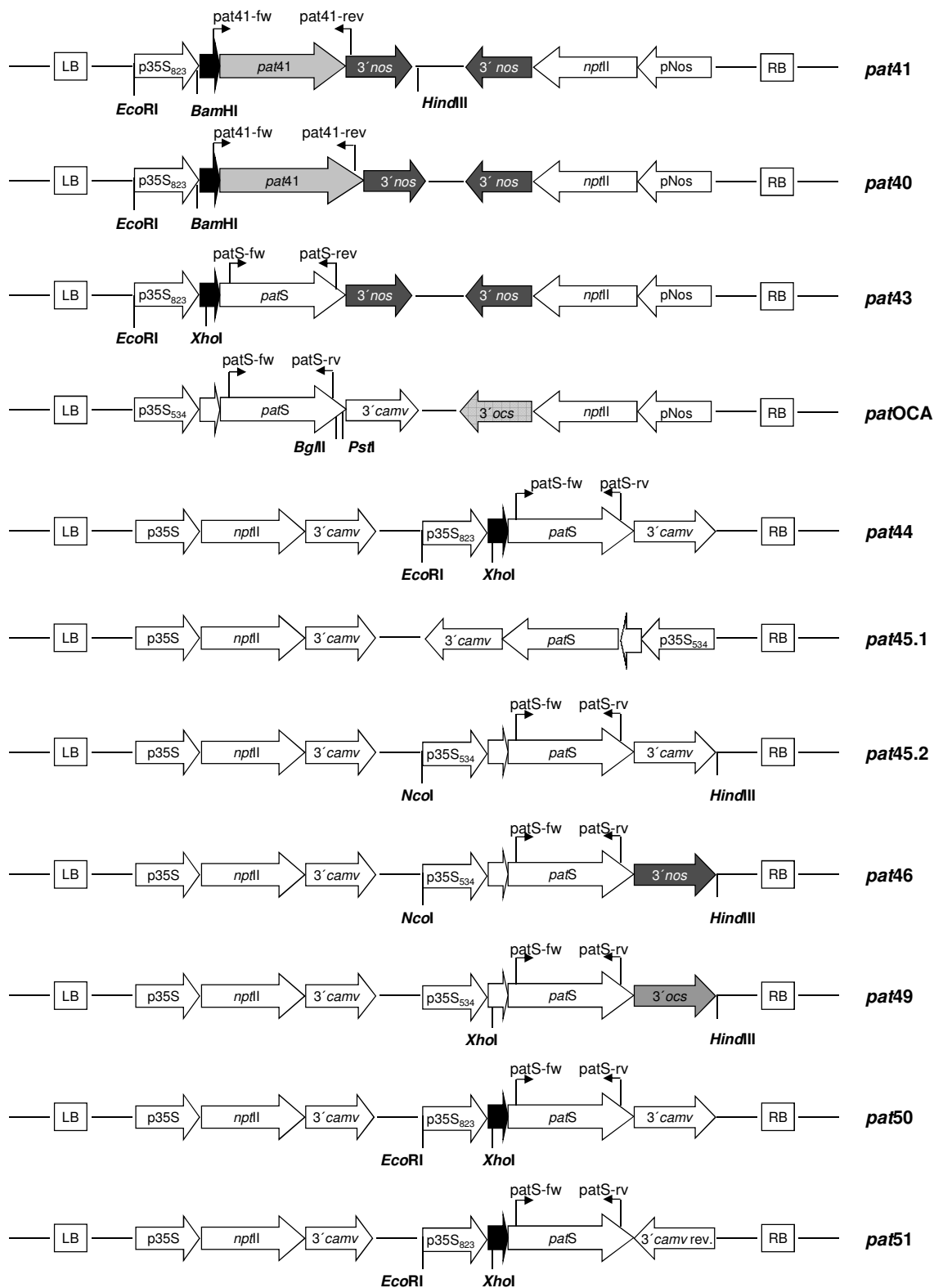
- Pietrzak, M., Shillito, R., Hohn, T., Potrykus, I.** (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic-resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Res* **14**:5857-5868.
- Proudfoot, N.** (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* **25**:290-293.
- Proudfoot, N.** (2004) New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* **16**:272-278.
- Pröls, F. and Meyer, P.** (1992) The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J* **2**:465-475.
- Que, Q., Wang, H., Jorgensen, R.** (1998) Distinct patterns of pigment suppression are produced by allelic sense and antisense chalcone synthase transgenes in petunia flowers. *Plant J* **13**:401-409.
- Ratcliff, F., Harrison, B., Baulcombe, D.** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**:1558-1560.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J.** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**:675-709.
- Rothnie, H., Reid, J., Hohn, T.** (1994) The contribution of AAUAAA and the upstream element UUUGUA to the efficiency of mRNA 3'-end formation in plants. *Embo J* **13**:2200-2210.
- Rothnie, H.** (1996) Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol Biol* **32**:43-61.
- Sachs, A. and Varani, G.** (2000) Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* **7**:356-361.
- Samadder, P., Sivamani, E., Lu, J., Li, X., Qu, R.** (2008) Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice rubi3 gene in transgenic rice cells. *Mol Genet Genom* **279**:429-439.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbour Press.
- Sanfaçon, H. and Hohn, T.** (1990) Proximity to the promoter inhibits recognition of cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Nature* **346**:81-84.
- Sanfaçon, H., Brodmann, P., Hohn, T.** (1991) A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Genes Dev* **5**:141-149.
- Sauer, H., Wild, A., Ruhle, W.** (1987) The effect of Phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis. 2. The causes of inhibition of photosynthesis. *Z Naturforsch* **42**:270-278.
- Scharf, K., Hohfeld, I., Nover, L.** (1998) Heat stress response and heat stress transcription factors. *J Biosci* **23**:313-329.
- Schmidt, G. and Delaney, S.** (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol Genet Genom* **283**:233-241.
- Schmittgen, T. and Zakrajsek, B.** (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Meth* **46**:69-81.
- Schwartz, A., Komarova, T., Skulachev, M., Zvereva, A., Dorokhov, Y., Atabekov, J.** (2006) Stability of plant mRNAs depends on the length of the 3'-untranslated region. *Biochem Moscow* **71**:1377-1384.
- Seitz, T.; Hoffmann, M.G.; Krähmer, H.** (2003): Herbizide für die Landwirtschaft: Chemische Unkrautbekämpfung. in: *Chemie in unserer Zeit* **37**:112-126
- Shabalina, S., Ogurtsov, A., Spiridonov, N.** (2006) A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res* **34**:2428-2437.
- Shen, Y., Ji, G., Haas, B., Wu, X., Zheng, J., Reese, G., Li, Q.** (2008) Genome level analysis of rice mRNA 3'-end processing signals and alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* **36**:3150-3161.
- Shimamura, K., Oka, S., Shimotori, Y., Ohmori, T., Kodama, H.** (2007) Generation of secondary small interfering RNA in cell-autonomous and non-cell autonomous RNA silencing in tobacco. *Plant Mol Biol* **63**:803-813.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R., Fire, A.** (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**:465-476.

- Smith, A.** (1988) Persistence and transformation of the herbicide [C¹⁴]Glufosinate-Ammonium in prairie soils under laboratory conditions. *J Agricul Food Chem* **36**:393-397.
- Sonenberg, N.** (1994) Regulation of translation and cell growth by eIF-4E. *Biochimie* **76**:839-846.
- Stam, M., Mol, J., Kooter, J.** (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot* **79**:3-12.
- Strauch, E., Wohlleben, W., Pühler, A.** (1988) Cloning of a phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* **63**:65-74.
- Suo, G., Chen, B., Zhang, J., Duan, Z., He, Z., Yao, W., Yue, C., Dai, J.** (2006) Effects of codon modification on human BMP2 gene expression in tobacco plants. *Plant Cell Rep* **25**:689-697.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z., Burgyan, J.** (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *Embo J* **22**:633-640.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., Takematsu, T.** (1986) Action mechanism of Bialaphos. 2. Accumulation of ammonia in plants treated with Bialaphos. *J Pest Sci* **11**:33-37.
- Takahashi, T. and Komeda, Y.** (1992) Heat-Shock induced accumulation of extremely long transcripts containing the rDNA intergenic spacer in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **33**:389-394.
- Tebbe, C. and Reber, H.** (1988) Utilization of the herbicide phosphinothricin as a nitrogen source by soil bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **29**:103-105.
- Thompson, C., Movva, N., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J., Lauwereys, M., Botterman, J.** (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *streptomyces hygroscopicus*. *Embo J* **6**:2519-2523.
- Vaistij, F., Jones, L., Baulcombe, D.** (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* **14**:857-867.
- van Engelen, F., Schouten, A., Molthoff, J., Roosien, J., Salinas, J., Dirkse, W., Schots, A., Bakker, J., Gommers, F., Jongsma, M., Bosch, D., Stiekema, W.** (1994) Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **26**:1701-1710.
- van Leeuwen, W., Ruttink, T., Borst-Vrens, A., van der Plas, L., van der Krol, A.** (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J Exp Bot* **52**:949-959.
- Vaucheret, H., Palauqui, J., Elmayan, T., Moffatt, B.** (1995) Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **248**:311-317.
- Vaucheret, H. and Fagard, M.** (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**:29-35.
- Vinnemeier, J., Dröge-Laser, W., Pistorius, E., Broer, I.** (1995) Purification and partial characterization of the *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 phosphinothricin-N-acetyltransferase mediating herbicide resistance to transgenic plants. *Z Naturforsch* **50**:796-805.
- Voinnet, O. and Baulcombe, D.** (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**:553.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D.** (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**:177-187.
- Wadkins, R., Jares-Erijman, E., Klement, R., Rudiger, A., Jovin, T.** (1996) Actinomycin D binding to single-stranded DNA: Sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and H-1 NMR spectroscopy. *J Mol Biol* **262**:53-68.
- Walter, C., Broer, I., Hillemann, D., Pühler, A.** (1992) High frequency, heat treatment-induced inactivation of the phosphinothricin resistance gene in transgenic single cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Mol Gen Genet* **235**:189-196.
- Walter, S.** (2001) Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung: Regulation über spezifische DNA-Elemente und Proteinfaktoren. Diplomarbeit.

- Wang, M. and Waterhouse, P.** (2000) High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Mol Biol* **43**:67-82.
- Wang, X., Zhang, J., Gu, J., He, T., Zhang, X., Li, Y., Li, F.** (2005) MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics* **21**:3610-3614.
- Waterhouse, P., Wang, M., Lough, T.** (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**:834-842.
- Wild, A. and Manderscheid, R.** (1984) The effect of Phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **39**:500-504.
- Wild, A., Sauer, H., and Ruhle, W.** (1987) The effect of Phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis. 1. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. *Z Naturforsch* **42**:263-269.
- Williamson, J., Hirschwyncott, M., Larkins, B., Gelvin, S.** (1989) Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **90**:1570-1576.
- Wilkie, G., Dickson, K., Gray, N.** (2003) Regulation of mRNA translation by 5' and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* **28**:182-188.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., Pühler, A.** (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **70**:25-37.
- Xing, A., Moon, B., Mills, K., Falco, S., Li, Z.** (2010) Revealing frequent alternative polyadenylation and widespread low-level transcription read-through of novel plant transcription terminators. *Plant Biotechnol J* **8**:772-782.
- Yang, L., Wakasa, Y., Kawakatsu, T., Takaiwa, F.** (2009) The 3'-untranslated region of rice glutelin GluB-1 affects accumulation of heterologous protein in transgenic rice. *Biotechnol Lett* **31**:1625-1631.
- Yoo, B., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y., Lough, T., Lucas, W.** (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**:1979-2000.
- Zhu, W., Ouyang, S., Iovene, M., O'Brien, K., Vuong, H., Jiang, J., Buell, C.** (2008) Analysis of 90 Mb of the potato genome reveals conservation of gene structures and order with tomato but divergence in repetitive sequence composition. *Bmc Genomics* **9**.
- Zuker, M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**:3406-3415.

F Anhang

F1 Restriktionsschnittstellen und Bindestellen der *pat* spezifischen Sonden für die Southern Blot Analysen.



F2 Sequenzen und Sequenzvergleiche

F2.1 Sequenzvergleich der in den *pat*-Konstrukten verwendeten CaMV 35S Promotorversionen

Sequenzvergleich des 823 bp großen - und 534 bp großem CaMV 35S Promotorfragment mit dem CaMV 35S. Sequenzübereinstimmungen sind grau unterlegt. TATA- und CAAT-Boxen sind fett dargestellt.

```

CaMV -----
CaMV534 -----
CaMV823 GAATTCCCTTTTCAGAAAGAATGCTAACCCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGT

CaMV -----
CaMV534 -----
CaMV823 CTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCCAAGAAG

CaMV -----
CaMV534 -----
CaMV823 GTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTCAAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATA

CaMV -----
CaMV534 -----
CaMV823 TTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCA

CaMV -----
CaMV534 -----GAATTC CATG
CaMV823 AGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATG

CaMV -----
CaMV534 GAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGGAACAGTTC
CaMV823 GAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTC

CaMV -----
CaMV534 ATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAC
CaMV823 ATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAC

CaMV -----T
CaMV534 GACACGCTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATT
CaMV823 GACACGCTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATT

CaMV GAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
CaMV534 GAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
CaMV823 GAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC

CaMV TGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
CaMV534 TGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
CaMV823 TGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC

CaMV GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CaMV534 GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CaMV823 GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC

CaMV CCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
CaMV534 CCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
CaMV823 CCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGT

CaMV GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCACTTATCCTTCGCA
CaMV534 GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCACTTATCCTTCGCA
CaMV823 GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCACTTATCCTTCGCA

```

CaMV AGACCCCTTCCTCT**TATATAA**GGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGA
 CaMV₅₃₄ AGACCCCTTCCTCT**TATATAA**GGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGA
 CaMV₈₂₃ AGACCCCTTCCTCT**TATATAA**GGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGG

CaMV: 343 bp partielle Sequenz der CaMV-DNA aus Franck et al. (1980)

CaMV₈₂₃: 823 bp (Kriete et al., 1995)

CaMV₅₃₄: 534 bp (Eckes et al., 1989)

F2.2 Sequenzvergleich der *patS*- und *pat41*-Kodierregion

Sequenzvergleich der *pat41*-Kodierregion aus *Streptomyces viridochromogenes* mit der modifizierten *patS*-Kodierregion (Eckes et al., 1989). Sequenzübereinstimmungen sind grau unterlegt. Start- und Stopp-Codons sind fett dargestellt.

<i>patS</i>	ATG TCTCCGGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAGGCCAGCTACAGCAGCTGATATGGCCGCG
<i>pat41</i>	ATG AGCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCGCCGCCGACATGGCGGCG
<i>patS</i>	GTTTGTGATATCGTTAACCATTACATTGAGACGTTCTACAGTGAACCTTTAGGACAGAGCCA
<i>pat41</i>	GTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCAACTTCCGTACGGAGCCG
<i>patS</i>	CAAACACCACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGTTGCAAGATAGATACCCTTGGTTG
<i>pat41</i>	CAGACTCCGCAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGGACCCTACCCCTGGCTC
<i>patS</i>	GTTGCTGAGGTTGAGGGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAGG
<i>pat41</i>	GTGCGCGAGGTGGAGGGCGTCGTCGCCGGCATCGCTACGCCGGGCCCTGGAAGGCCCGC
<i>patS</i>	AACGCTTACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTGTCACATAGGCATCAAAGGTTG
<i>pat41</i>	AACGCCATCGACTGGACCGTCGAGTCGACGGTGTACGTCTCCACCGGCACCAGCGGCTC
<i>patS</i>	GGCCTAGGATCCACATTGTACACACATTGCTTAAGTCTATGGAGGCGCAAGGTTTTAAG
	GGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGGAGGCCAGGGCTTCAAG
<i>patS</i>	TCTGTGGTTGCTGTTATAGGCCTTCCAAACGATCCATCTGTTAGGTTGCATGAGGCTTTG
<i>pat41</i>	AGCGTGGTTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGCGCCTGCACGAGGCGCTC
<i>patS</i>	GGATACACAGCCCGGGGTACATTGCGCGCAGCTGGATACAAGCATGGTGGATGGCATGAT
<i>pat41</i>	GGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGCACGGGGGCTGGCACGAC
<i>patS</i>	GTTGGTTTTTGGCAAAGGGATTTTGAGTTGCCAGCTCCTCCAAGGCCAGTTAGGCCAGTT
<i>pat41</i>	GTGGGGTTCTGGCAGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCGCCCCGCCCCGTCCGGCCCGTC
<i>patS</i>	ACCCAGATCT TGA
<i>pat41</i>	ACACAGATCCTC TGA

patS: 552 bp / 49 % GC-Gehalt (Eckes et al., 1989)

pat41: 555 bp / 69 % GC-Gehalt (Wohlleben et al., 1988)

F2.3 Sequenzvergleich der verwendeten Transkriptionsterminatoren

Sequenzen des 3′*nos* (Bevan et al., 1983; Yang et al., 2009), 3′*ocs* (MacDonald et al., 1991), 3′*camv* (Sanfaçon et al., 1990; Guerineau et al., 1991) und 3′*camv* in *antisense* Orientierung (diese Arbeit). In diesen Arbeiten beschriebene Major CS sind mit fetten Pfeilen, Minor CS mit dünnen Pfeilen markiert. NUE-Sequenzen und Stopp-Codons sind fett dargestellt. Gestrichelte Linie über Sequenz am 5′ Ende kennzeichnet die 3′ UTRS. Waagerechte Pfeile über Sequenzen des 3′*camv* markieren die perfekten und imperfekten Wiederholungen der TTTGTA-Sequenzen.

3′ *nos* TGA^{.....}GTCGACTGAGATCCCCGATCGTTCAAACATTTGGC**AATAAA**GTTTCTTAAGATTGAATCCTG
 TTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGT**AATAAT**TAAC
 ATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTA
 ATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTA
 TGTTACTAGATCGGGAA

kryptische poly(A)-Stelle

↑ ↑

3′ *ocs* TGA^{.....}GTCGACCTGCAGGCATGCCTGCTTTAATGAGATATGCGAGACGCCTATGATCGCATGATATT
 TGCTTTCAATTCTGTTGTGCACGTTGTAAAAACCTGAGCATGTGTAGCTCAGATCCTTACCGCC
 GGTTTCGGTTCATTCTAAT**AATATA**TCACCCGTTACTATCGTATTTTTAT**AATAAT**ATTCTCC
 GTTCA¹ATTTACTGATTGTACCCTACTACTTATATGTACAATATTAAAATGAAAACAATAT^AATTGT
 GCTGA^BATAGTTTATAGCGACATCTATGATAGAGCGCCACAATAACAAACAATTGCGTTTTATTA
 TTACAAATCCAATTTTAAAAAAGCGGCAGAACCGGTCAAACCTAAAAGACTGATTACATAAATC
 TTATTCAAATTTCAAAGGCCCGGGCTAGTATCTACGACACACCGAGCGGCGAACTAATAAC
 GTTCACTGAAGGGA^CACTCCGGTTCCCCGCCGGCGCGCATGGGTGAGATTCCTTGAAGTTGAGTAT
 TGGCCGTCCGCTCTACCGAAAGTTACGGGCACCATTC AACCCGGTCCAGCACGGCGCGCGGTAA
 CCGACTTGCTGCCCCGAGAATTATGCAGCATTTTTTTGGTGTATGTGGGCCCCAAATGAAGTGCA
 GGTCAAACCTTGACAGTGACGACAAATCGTTGGGCGGGTCCAGGGCGAATTTTGCGACAACATGT
 CGAGGCTCAGCAGGACCTGCAGGCATGCAAGCTAGCTTACTAGTGATGCATATTCTATAGTGTCA
 CCTAAAT

3′ *camv* TGA^{.....}GTCGACTGAGACCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAATAAT
 GTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATA
 TAAGAAACCCCTTAGTATGTATTGTATTGTAAAATACTTCTATC**AATAAA**ATTCTAATTCCTA
 AAACCAAATCCAGTGGGTACCGAG

↑

3′ *camv* reverse TGA^{.....}GTCGACCCACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAATTTTATTGATAGAAGTATTTTACAAT
 ACAAATACATACTAAGGGTTTCTTATATGCTCAACACATGAGCGAAACCCCTATAAGAACCCTAAT
 TCCCTTATCTGGGA^{.....}ACTACTCACACATTATTATGAGAGAGATAGATTTAGTAGAGAGAGACTGGT
 GATTTTCAGCGGCATGCCTGCAGGA

F3 Codon Usage des *pat41*-, *pat40*- und *pat43*-Kodierbereichs im Vergleich zum Kodierbereich endogener Tabak- und Kartoffelgene

Aminosäure	Gesamt-Anzahl	Triplett	Anzahl in <i>pat41</i>	Anzahl in <i>pat40</i>	Anzahl in <i>pat43</i>	Häufigkeit Tabak (‰)	Häufigkeit Kartoffel (‰)
Alanin	18	GCT	-	-	12	31.2	30.7
		GCC	13	13	2	12.5	10.8
		GCA	1	1	2	23.1	22.2
		GCG	4	4	2	5.8	4.7
Valin	18	GTT	-	-	14	26.8	28.5
		GTC	13	13	-	11.1	10.4
		GTG	5	5	4	16.7	15.7
Arginin	15/16/15	CGT	2	3	-	7.5	8.1
		CGC	8	8	2	3.9	3.4
		CGA	1	1	-	5.3	5.4
		CGG	4	4	-	3.7	2.8
		AGA	-	-	2	16.0	14.8
		AGG	-	-	11	12.2	11.3
Prolin	14/15/14	CCT	-	-	2	18.7	19.0
		CCC	7	8	1	6.6	6.6
		CCA	1	1	10	19.8	19.0
		CCG	6	6	1	5.0	4.7
Leucin	14/14/13	CTT	-	-	2	24.0	25.9
		CTC	6	6	-	12.3	12.1
		CTA	-	-	2	9.4	10.3
		CTG	8	8	-	10.2	10.0
		TTA	-	-	-	13.4	14.4
		TTG	-	-	9	22.3	24.5
Glycin	13	GGT	-	-	6	22.3	23.4
		GGC	7	7	2	11.2	10.1
		GGA	3	3	4	23.2	24.9
		GGG	3	3	1	10.5	9.7
Threonin	12	ACT	1	2	1	20.3	21.2
		ACC	5	5	1	9.7	8.9
		ACA	1	1	9	17.4	18.2
		ACG	5	5	1	4.5	4.0
Glutamat	12	GAG	11	11	12	29.4	27.3
		GAA	1	1	-	36.0	36.2
Aspartat	9/10/9	GAT	-	1	9	36.9	39.3
		GAC	9	9	-	16.9	15.2
Serin	8/9/8	TCT	-	-	5	20.2	20.2
		TCC	3	3	1	10.2	9.5
		TCA	-	1	1	17.6	18.7
		TCG	1	1	-	5.3	4.9
		AGT	-	-	1	13.3	14.8
		AGC	4	4	-	10.0	8.5
Tyrosin	8	TAC	8	8	8	13.5	13.2
Glutamin	7/8/7	CAA	-	1	6	20.7	21.1
		CAG	7	7	1	15.0	13.1
Isoleucin	7/8/7	ATT	-	1	4	27.8	29.3
		ATC	7	7	2	13.9	14.4
		ATA	-	-	1	14.0	13.6
Histidin	7	CAT	-	-	7	13.4	15.2
		CAC	7	7	-	8.7	7.7
Tryptophan	6/7/6	TGG	6	7	6	12.2	12.9
Asparagin	4/5/4	AAT	1	1	-	28.0	29.7
		AAC	3	4	4	17.9	16.6
Phenylalanin	4	TTT	-	-	4	25.1	26.4
		TTC	4	4	-	18.0	18.1
Lysin	4	AAG	4	4	4	33.5	32.7
Methionin	3	ATG	3	3	3	25.0	24.3
Cystein	1	TGT	-	-	1	9.8	10.6
		TGC	1	1	-	7.2	6.8

F4 Datengesamtübersicht für Tabak zur *pat*-Expression unter normalen- und Hitzestressbedingungen

Die Pat Proteinkonzentration der Tabakpflanzen bei 24 °C wurde mithilfe eines Pat-ELISA (Steffens Biotechnische Analysen GmbH) im Verhältnis zum gesamtlöslichen Protein (TSP) bestimmt. Die Bestimmung der relativen *pat* mRNA-Gehalte erfolgte mittels der quantitativen Reverse Transkriptase real-time PCR (qRT-PCR) mit dem Bio-Rad iQ5 Detektionssystem. Die Expressionslevel wurden anhand der Transkriptmengen des internen Referenzgens *actin1* mithilfe der $2^{-\Delta CT}$ -Methode normalisiert ($2^{-\Delta CT}$ = relative Transkriptmenge; $\Delta C_T = C_T^{pat} - C_T^{actin1}$). Grau hinterlegte Felder kennzeichnen die Werte, die zur Ermittlung der durchschnittlichen Pat Protein- und mRNA-'steady state level' des jeweiligen Konstruktes herangezogen wurden.

Die Reaktion auf 10-tägigen Hitzestress von 37 °C wurde auf Proteinebene mithilfe der Western Blot Analyse und des enzymatischen Pat-Tests im Vergleich zu einem ungestressten Klon analysiert. Auf RNA-Ebene erfolgte die Analyse ebenfalls mit der qRT-PCR mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Hierbei wird zunächst der C_T -Wert für *pat* vom C_T -Wert für die *actin1* abgezogen (ΔC_T), die beiden ΔC_T -Werte der 24 °C (Kontrolle)- und 37 °C (Hitze)-Probe anschließend voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) und in die Gleichung n -fache Expression (Kontrolle zu Hitze) = $2^{-\Delta\Delta CT}$ eingesetzt. Ein Wert um 1 gibt die Stabilität der RNA unter Hitzebedingungen wider; ein Wert unter 0,5 zeigt eine Abnahme und ein Wert über 2 eine Zunahme der *pat* RNA nach Hitzestress an.

Tabak	Grundexpression				Reaktion nach Hitzestress	
Konstrukt	Linie	Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RNA (rE)	Kopien	Protein	RNA*
SRI	-	-	-	-	-	-
SRI/OCA T₁	59	409,54	119,68		Zunahme	1,38
	55	433,62	217,92	2	Zunahme	1,4
	47	1112,27	624,64	1	Zunahme	1,39
	2 (H4)	487,69	548,31	1	Zunahme	3,89
	58	719,04			Zunahme	
	44	704,73			Zunahme	
	40	1127,97			Zunahme	
	29	877,10			Zunahme	
	67	422,79	332,80	1	Zunahme	2,31
	26	1165,30			Zunahme	
	53	931,67	294,07		Zunahme	
	64	657,96		1	Zunahme	4,00
	60	604,76			stabil	
	61	310,18			stabil	
SRI/16.41 T₁	28	5,21			Abnahme	
	8	10,55	0,457	4	Abnahme	0,82
	148	4,91			Abnahme	
	153	3,17	2,885	2	Abnahme	0,15
	154	10,96			Abnahme	
	158	6,47	0,342	1	Abnahme	0,16
	1	4,63			Abnahme	
	3	5,56	0,447	2	Abnahme	0,26
	84	5,68			Abnahme	
	156	5,72	1,974	2	Abnahme	
	163	4,63			Abnahme	
	15	7,45			Abnahme	
RI/16.40 T₁	31	5,92			Abnahme	
	32	8,78			Abnahme	
	41	6,60			Abnahme	
	53	7,01			Abnahme	
	3	6,53	7,190	2	Abnahme	0,440
	5	6,20	1,099	2	Abnahme	0,008
	22	11,41	12,320	1	Abnahme	0,497
	107	7,18	1,826		Abnahme	0,430
	26	9,91	7,040		Abnahme	0,500
	111	0,68	7,864	2	Abnahme	0,688
	14	2,57			Abnahme	
	25	0,97			Abnahme	

Tabak Konstrukt	Linie	Grundexpression		Kopien	Reaktion nach Hitzestress	
		Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RNA (rE)		Protein	RNA*
SRI/16.43 T ₁	3a	8,02	4,164		Abnahme	
	3f	55,93	9,120		Abnahme	0,668
	17	14,35			Abnahme	
	7	18,17	4,080	2	Abnahme	0,140
	51	44,58	3,060	1	Abnahme	0,150
	4	28,61			Abnahme	
	34	21,92			Abnahme	
	5	37,14	3,74		Abnahme	0,130
	16	55,11			Abnahme	
	3b	16,93			Abnahme	
SRI/16.44 T ₀	4	16,88	5,888	1	stabil	0,151
	9	63,54		1	stabil	
	11	6,10		1	Abnahme	
	12	10,38	3,796	1	stabil	0,780
	13	41,68		1	stabil	
	17	2,503		2		
	18	80,42	5,555	3	Abnahme	1,010
	19	21,30		1	Abnahme	
	21	8,43	10,349	1	stabil	0,820
	22	19,71	3,49	1	Abnahme	0,230
	23	23,51	3,71	1	stabil	0,820
	3			1	stabil	
	20			2	stabil	
	1				stabil	
	6				stabil	
	8				stabil	
	10				stabil	
	14				stabil	
	15				stabil	
	16				stabil	
SRI/16.45.1 T ₁	6				Abnahme	
	7				stabil	
	53				Abnahme	
	68				Abnahme	
	86				Abnahme	
SRI/16.45.2 T ₁	5	71,182	15,51	2	Zunahme	2,280
	58	57,052	4,64	2	Zunahme	43,410
	96	13,146	10,16		Zunahme	1,570
	77	2,906			stabil	
	112	10,319			stabil	
	15	17,161	5,44	1	Zunahme	13,550
	54	43,694	5,24	2	Zunahme	6,960
	18	4,304	4,00	2	Zunahme	6,964
	69	12,382			Zunahme	
	61	13,700			Zunahme	
SRI/16.46 T ₀	67	59,128		1	Zunahme	
	36	8,15		3	stabil	
	61	82,03		1	Zunahme	2,570
	62	12,240		5	Abnahme	
	67	12,92		3	stabil	
	68	96,91		3	stabil	
	71	108,55		3	Zunahme	2,750
	73	11,79		4	Zunahme	
	23	40,670		5	Abnahme	0,480
	9	9,200			Abnahme	
	48	60,370		1	stabil	
	72	30,280		1	stabil	
	20	27,350		2	stabil	
	32	16,140		2	Abnahme	
	39	8,540		2	stabil	
	43	5,240		2	Abnahme	
	46	50,780		2	stabil	
	21	1,830		3	stabil	
	41	13,090		4	stabil	
	90	96,700		4	stabil	
	60	72,500		1	Zunahme	

Tabak Konstrukt	Linie	Grundexpression		Kopien	Reaktion nach Hitzestress	
		Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RNA (rE)		Protein	RNA*
SRI/16.46 T ₀	64	83,160		1	Zunahme	
	76	21,270		1	Zunahme	
	8	6,637			Abnahme	
	70			4	Abnahme	
	10				Abnahme	
	21				Abnahme	
	29				Abnahme	
	7	11,242		2	stabil	
	16	19,801			stabil	
	17				stabil	
	18			4	stabil	
	20	19,104			stabil	
	22				stabil	
	26				stabil	
	28				stabil	
	30				Abnahme	
	45				Zunahme	
	33				stabil	
	34				stabil	
SRI/16.49 T ₀	1	4,000	1,82		stabil	1,970
	2	16,600			stabil	
	24	7,389	1,00	1	stabil	
	5	4,600		2	stabil	
	6	6,500			stabil	
	12	7,500	1,74		Abnahme	
	9	6,800			stabil	
	19	7,200	2,14	2	Abnahme	
	15	2,700	0,878		stabil	7,620
	16	13,200	6,487	1	stabil	1,070
SRI/16.50 T ₀	4	20,800	0,509	1	stabil	10,560
	13	11,400	0,455	2	Abnahme	0,220
	1	355,811		1	stabil	
	2	207,153	56,05		stabil	
	3	504,800		1	stabil	
	6	210,660		1	stabil	
	8	526,781	49,92	2	Abnahme	0,366
	10	839,063	20,70		stabil	
	11	814,290		2	stabil	
	4	161,818	59,20		Abnahme	0,374
	18	452,811			stabil	
	20	658,493			stabil	1,094
	32	277,310		2	stabil	
	33	500,612	18,906	2	Abnahme	0,020
	39	735,434	92,400	3	stabil	
	13	161,818	18,240	2	Abnahme	0,107
	17	86,385	43,200		Abnahme	0,031
SRI/16.51 T ₀	1	0,693	1,35	2	Abnahme	0,710
	2	0,595	1,06		Abnahme	0,550
	8	0,332			Abnahme	
	10	0,328	0,009	2	Abnahme	1,540
	11	0,398			Abnahme	
	12	0,258	0,18		Abnahme	0,400
	13	0,290			Abnahme	
	14	0,318	0,16		Abnahme	
	3	0,090		2	Abnahme	
	24	0,320		1	Abnahme	
	15	0,374			Abnahme	
	20	0,698	2,695	2	Abnahme	1,090

* < 0,5 = Abnahme; 0,5 - 2 = stabil; > 2 = Zunahme

Tabak T1		Anzahl getesteter Geschwister	Reaktion nach Hitzestress (Protein)	Kopien	Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RNA (rE)
Konstrukt	Linie					
SRI/16.44	1.4.	11	stabil		90,56	
	3.1.	7	stabil		35,77	
	3.2.	4	stabil	1,2,4	104,30	
	3.38.	2	stabil			
	3.6.	6	stabil		65,24	
	3.7.	8	Abnahme		31,44	
	3.8.	4	stabil			
	4.1.	6	Abnahme	2	65,83	
		5	stabil	2		
	4.3.	2	stabil		64,36	
	4.4.	6	Abnahme	3	15,22	
		6	stabil	3		
	4.5.	7	Abnahme			
	5.17.	15	Abnahme		10,80	
	5.3.	6	Abnahme	1,3,4	7,73	
	5.38.	5	stabil		26,50	
	5.48.	2	stabil		14,21	
	5.64.	4	stabil		45,93	
	5.89.	11	Abnahme	1,2,4	101,09	
		8	stabil	1,2,4	80,70	
	5.107.	5	stabil	2	69,59	
SRI/16.46	5.18.	6	stabil			
	5.19.	6	stabil			
	5.84.	6	stabil			
	20	6	Zunahme			
	21	4	Zunahme			
	32	6	stabil			
	36	6	stabil		19,55	
	39	6	Zunahme			
	41	6	Zunahme			
	43	6	Zunahme		16,12	17,12
	61	6	Zunahme		57,31	53,76
	62	5	stabil		23,00	
	67	6	stabil		39,89	
	68	4	Zunahme		110,70	109,44
	70	5	Abnahme			
	71	5	Zunahme		73,01	36,80
	72	6	Zunahme			
	73	6	stabil		69,88	
	76	6	Zunahme			
	23	2	stabil		4,83	6,08
	9	2	Zunahme		1,21	

*Grau hinterlegte Felder bei *pat44* Linien kennzeichnen die Linien, bei denen sich Geschwister der T₁-Generation in ihrer Reaktion auf moderaten Hitzestress unterschieden.

*Grau hinterlegte Felder bei *pat46* Linien kennzeichnen die Linien, die zur Bestimmung des Mittelwertes des Konstrukts herangezogen wurden.

F5 Datengesamtübersicht für Kartoffel zur *pat*-Expression unter normalen- und Hitzestressbedingungen

Die Ermittlung der Daten erfolgte analog zum Tabak, es wurden jedoch zur Ermittlung der durchschnittlichen Pat Protein- und mRNA-'steady state level' des jeweiligen Konstruktes alle ermittelten Daten herangezogen. Grau hinterlegte Felder stellen jeweils Klone dar.

Kartoffel		Grundexpression		Kopien	Reaktion nach Hitzestress	
Konstrukt	Linie	Pat/TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RNA (rE)		Protein	RNA*
S.t. Albatros	-	-	-	-	-	-
S.t. Albatros/OCA	3	96,91	59,520	2	Zunahme	2,549
	9	115,19	51,200		Zunahme	2,828
	11	113,20	57,920		Zunahme	4,532
S.t. Albatros/16.41	10	1,84	1,151	1	Abnahme	0,346
	20	1,49	2,191		Abnahme	0,063
	26	1,18	1,086		Abnahme	0,316
S.t. Albatros/16.40	33	2,51	10,036	2	Abnahme	0,022
	36	4,62	7,190	3	Abnahme	0,072
	37	4,43	11,309		Abnahme	0,033
	41	2,79	-		Abnahme	-
	62	4,04	6,216	2	Abnahme	0,061
	63	3,30	10,485		Abnahme	0,032
	66	4,31	-		Abnahme	-
	65	5,81	-	2	Abnahme	-
	84	3,16	-	2	Abnahme	-
	94	4,21	-	2	Abnahme	-
	93	4,29	6,591	2	Abnahme	0,078
S.t. Albatros/16.43	55	17,97	15,520	1	Abnahme	0,104
	39	29,55	9,520		Abnahme	0,014
	18	24,27	9,76	-	Abnahme	n.d.
	41	24,87	6,88	1	Abnahme	0,078
	12	18,67	13,44	1	Abnahme	0,005
	16	16,93	4,40		Abnahme	0,046
S.t. Albatros/16.44	15	28,00	6,080	1	stabil	0,758
	17	2,16	2,080	1	Abnahme	0,448
	21	46,45	13,920	1	Abnahme	0,240
	56	1,24	0,470	3	Abnahme	0,586
	47	83,80	-	-	Abnahme	-
	53	22,54	-	-	Abnahme	-
S.t. Albatros/16.45	7	47,167	9,04	1	stabil	1,320
	8	10,103	1,34	1	Zunahme	5,098
	19	28,272	-	3	Zunahme	-
	34	9,844	-	2	stabil	-
	42	37,127	22,240	2	Zunahme	4,000
	53	41,906	4,92	2	Zunahme	12,126
	59	15,135	-	1	Zunahme	-
	61	26,746	-	1	stabil	-
	62	71,094	-	1	Zunahme	-
	66	120,495	31,200	2	stabil/Zunahme	1,414
	67	12,698	5,440	2	Zunahme	3,580

n.d.= keine *pat*-mRNA in der Hitzeprobe zu detektieren; * < 0,5 = Abnahme; 0,5 -2 = stabil; > 2 = Zunahme

F6 Signifikanzanalysen

F6.1. Signifikanzanalyse für Tabak (alle Konstrukte): ProteinPat / TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Pat / TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)

			Abhängige Variable: pat / TSP (pg 9)				
(I) Konstrukt	(J) Konstrukt		Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Obergrenze	Untergrenze
Bonferroni	patOCA	pat41	739,71932(*)	55,66969	,000	552,1515	927,2871
		pat40	738,99233(*)	55,66969	,000	551,4245	926,5601
		pat43	715,92835(*)	55,66969	,000	528,3606	903,4961
		pat44	716,80955(*)	55,66969	,000	529,2418	904,3773
		pat45	722,56728(*)	55,66969	,000	534,9995	910,1351
		pat46	704,45605(*)	55,66969	,000	516,8883	892,0238
		pat49	738,35590(*)	55,66969	,000	550,7881	925,9237
		pat50	220,77816(*)	55,66969	,007	33,2104	408,3460
		pat51	745,57635(*)	55,66969	,000	558,0086	933,1441
	pat41	patOCA	-739,71932(*)	55,66969	,000	-927,2871	-552,1515
		pat40	-,72699	55,66969	1,000	-188,2948	186,8408
		pat43	-23,79097	55,66969	1,000	-211,3588	163,7768
		pat44	-22,90977	55,66969	1,000	-210,4776	164,6580
		pat45	-17,15204	55,66969	1,000	-204,7198	170,4157
		pat46	-35,26326	55,66969	1,000	-222,8311	152,3045
		pat49	-1,36342	55,66969	1,000	-188,9312	186,2044
		pat50	-518,94115(*)	55,66969	,000	-706,5089	-331,3734
		pat51	5,85703	55,66969	1,000	-181,7108	193,4248
	pat40	patOCA	-738,99233(*)	55,66969	,000	-926,5601	-551,4245
		pat41	,72699	55,66969	1,000	-186,8408	188,2948
		pat43	-23,06398	55,66969	1,000	-210,6318	164,5038
		pat44	-22,18278	55,66969	1,000	-209,7506	165,3850
		pat45	-16,42505	55,66969	1,000	-203,9928	171,1427
		pat46	-34,53628	55,66969	1,000	-222,1041	153,0315
		pat49	-,63643	55,66969	1,000	-188,2042	186,9314
		pat50	-518,21416(*)	55,66969	,000	-705,7820	-330,6464
		pat51	6,58402	55,66969	1,000	-180,9838	194,1518
	pat43	patOCA	-715,92835(*)	55,66969	,000	-903,4961	-528,3606
		pat41	23,79097	55,66969	1,000	-163,7768	211,3588
		pat40	23,06398	55,66969	1,000	-164,5038	210,6318
		pat44	,88120	55,66969	1,000	-186,6866	188,4490
		pat45	6,63893	55,66969	1,000	-180,9289	194,2067
		pat46	-11,47230	55,66969	1,000	-199,0401	176,0955
		pat49	22,42755	55,66969	1,000	-165,1402	209,9953
		pat50	-495,15018(*)	55,66969	,000	-682,7180	-307,5824
		pat51	29,64800	55,66969	1,000	-157,9198	217,2158
	pat44	patOCA	-716,80955(*)	55,66969	,000	-904,3773	-529,2418
		pat41	22,90977	55,66969	1,000	-164,6580	210,4776
		pat40	22,18278	55,66969	1,000	-165,3850	209,7506
		pat43	-,88120	55,66969	1,000	-188,4490	186,6866
		pat45	5,75773	55,66969	1,000	-181,8101	193,3255
		pat46	-12,35349	55,66969	1,000	-199,9213	175,2143
		pat49	21,54635	55,66969	1,000	-166,0214	209,1141
		pat50	-496,03138(*)	55,66969	,000	-683,5992	-308,4636
		pat51	28,76680	55,66969	1,000	-158,8010	216,3346
	pat45	patOCA	-722,56728(*)	55,66969	,000	-910,1351	-534,9995
		pat41	17,15204	55,66969	1,000	-170,4157	204,7198
		pat40	16,42505	55,66969	1,000	-171,1427	203,9928
		pat43	-6,63893	55,66969	1,000	-194,2067	180,9289
		pat44	-5,75773	55,66969	1,000	-193,3255	181,8101
		pat46	-18,11122	55,66969	1,000	-205,6790	169,4566
		pat49	15,78862	55,66969	1,000	-171,7792	203,3564
		pat50	-501,78911(*)	55,66969	,000	-689,3569	-314,2213
		pat51	23,00907	55,66969	1,000	-164,5587	210,5769

pat46	patOCA	-704,45605(*)	55,66969	,000	-892,0238	-516,8883
	pat41	35,26326	55,66969	1,000	-152,3045	222,8311
	pat40	34,53628	55,66969	1,000	-153,0315	222,1041
	pat43	11,47230	55,66969	1,000	-176,0955	199,0401
	pat44	12,35349	55,66969	1,000	-175,2143	199,9213
	pat45	18,11122	55,66969	1,000	-169,4566	205,6790
	pat49	33,89985	55,66969	1,000	-153,6679	221,4676
	pat50	-483,67789(*)	55,66969	,000	-671,2457	-296,1101
	pat51	41,12030	55,66969	1,000	-146,4475	228,6881
pat49	patOCA	-738,35590(*)	55,66969	,000	-925,9237	-550,7881
	pat41	1,36342	55,66969	1,000	-186,2044	188,9312
	pat40	,63643	55,66969	1,000	-186,9314	188,2042
	pat43	-22,42755	55,66969	1,000	-209,9953	165,1402
	pat44	-21,54635	55,66969	1,000	-209,1141	166,0214
	pat45	-15,78862	55,66969	1,000	-203,3564	171,7792
	pat46	-33,89985	55,66969	1,000	-221,4676	153,6679
	pat50	-517,57773(*)	55,66969	,000	-705,1455	-330,0099
	pat51	7,22045	55,66969	1,000	-180,3473	194,7882
pat50	patOCA	-220,77816(*)	55,66969	,007	-408,3460	-33,2104
	pat41	518,94115(*)	55,66969	,000	331,3734	706,5089
	pat40	518,21416(*)	55,66969	,000	330,6464	705,7820
	pat43	495,15018(*)	55,66969	,000	307,5824	682,7180
	pat44	496,03138(*)	55,66969	,000	308,4636	683,5992
	pat45	501,78911(*)	55,66969	,000	314,2213	689,3569
	pat46	483,67789(*)	55,66969	,000	296,1101	671,2457
	pat49	517,57773(*)	55,66969	,000	330,0099	705,1455
	pat51	524,79818(*)	55,66969	,000	337,2304	712,3660
pat51	patOCA	-745,57635(*)	55,66969	,000	-933,1441	-558,0086
	pat41	-5,85703	55,66969	1,000	-193,4248	181,7108
	pat40	-6,58402	55,66969	1,000	-194,1518	180,9838
	pat43	-29,64800	55,66969	1,000	-217,2158	157,9198
	pat44	-28,76680	55,66969	1,000	-216,3346	158,8010
	pat45	-23,00907	55,66969	1,000	-210,5769	164,5587
	pat46	-41,12030	55,66969	1,000	-228,6881	146,4475
	pat49	-7,22045	55,66969	1,000	-194,7882	180,3473
	pat50	-524,79818(*)	55,66969	,000	-712,3660	-337,2304

* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

µg Pat / g TSP					
Konstrukt		N	Untergruppe für Alpha = .05.		
			2	3	1
Duncan ^a	pat51	10	,4285		
	pat41	10	6,2855		
	pat40	10	7,0125		
	pat49	10	7,6489		
	pat45	10	24,5845		
	pat44	10	29,1953		
	pat43	10	30,0765		
	pat46	10	41,5488		
	pat50	10		525,2267	
	patOCA	10			746,0048
Signifikanz			,538	1,000	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 10,000.

F6.2 Signifikanzanalyse für Tabak (alle Konstrukte): Transkriptmenge (relative Einheiten)

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche							
Abhängige Variable:Transkriptmenge (relative Einheiten)							
(I) Konstrukt (J) Konstrukt			Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	patOCA	pat41	367,13141	43,95120	,000	212,6725	521,5903
		pat40	361,42101	43,95120	,000	206,9621	515,8799
		pat43	363,83629	43,95120	,000	209,3774	518,2952
		pat44	362,80870	43,95120	,000	208,3498	517,2676
		pat45	362,77397	43,95120	,000	208,3151	517,2329
		pat46	324,03001	43,95120	,000	169,5711	478,4889
		pat49	365,94059	43,95120	,000	211,4817	520,3995
		pat50	313,01414	43,95120	,000	158,5552	467,4731
		pat51	367,58188	43,95120	,000	213,1230	522,0408
	pat41	patOCA	-367,13141	43,95120	,000	-521,5903	-212,6725
		pat40	-5,71040	43,95120	1,000	-160,1693	148,7485
		pat43	-3,29512	43,95120	1,000	-157,7540	151,1638
		pat44	-4,32271	43,95120	1,000	-158,7816	150,1362
		pat45	-4,35743	43,95120	1,000	-158,8164	150,1015
		pat46	-43,10140	43,95120	1,000	-197,5603	111,3575
		pat49	-1,19082	43,95120	1,000	-155,6497	153,2681
		pat50	-54,11727	43,95120	1,000	-208,5762	100,3417
		pat51	,45047	43,95120	1,000	-154,0084	154,9094
	pat40	patOCA	-361,42101	43,95120	,000	-515,8799	-206,9621
		pat41	5,71040	43,95120	1,000	-148,7485	160,1693
		pat43	2,41528	43,95120	1,000	-152,0436	156,8742
		pat44	1,38769	43,95120	1,000	-153,0712	155,8466
		pat45	1,35297	43,95120	1,000	-153,1060	155,8119
		pat46	-37,39100	43,95120	1,000	-191,8499	117,0679
		pat49	4,51958	43,95120	1,000	-149,9393	158,9785
		pat50	-48,40687	43,95120	1,000	-202,8658	106,0521
		pat51	6,16087	43,95120	1,000	-148,2980	160,6198
	pat43	patOCA	-363,83629	43,95120	,000	-518,2952	-209,3774
		pat41	3,29512	43,95120	1,000	-151,1638	157,7540
		pat40	-2,41528	43,95120	1,000	-156,8742	152,0436
		pat44	-1,02759	43,95120	1,000	-155,4865	153,4313
		pat45	-1,06232	43,95120	1,000	-155,5212	153,3966
		pat46	-39,80628	43,95120	1,000	-194,2652	114,6526
		pat49	2,10430	43,95120	1,000	-152,3546	156,5632
		pat50	-50,82215	43,95120	1,000	-205,2811	103,6368
		pat51	3,74559	43,95120	1,000	-150,7133	158,2045
	pat44	patOCA	-362,80870	43,95120	,000	-517,2676	-208,3498
		pat41	4,32271	43,95120	1,000	-150,1362	158,7816
		pat40	-1,38769	43,95120	1,000	-155,8466	153,0712
		pat43	1,02759	43,95120	1,000	-153,4313	155,4865
		pat45	-,03473	43,95120	1,000	-154,4936	154,4242
		pat46	-38,77869	43,95120	1,000	-193,2376	115,6802
		pat49	3,13189	43,95120	1,000	-151,3270	157,5908
		pat50	-49,79456	43,95120	1,000	-204,2535	104,6644
		pat51	4,77318	43,95120	1,000	-149,6857	159,2321
	pat45	patOCA	-362,77397	43,95120	,000	-517,2329	-208,3151
		pat41	4,35743	43,95120	1,000	-150,1015	158,8164
		pat40	-1,35297	43,95120	1,000	-155,8119	153,1060
		pat43	1,06232	43,95120	1,000	-153,3966	155,5212
		pat44	,03473	43,95120	1,000	-154,4242	154,4936
		pat46	-38,74397	43,95120	1,000	-193,2029	115,7150
		pat49	3,16662	43,95120	1,000	-151,2923	157,6255
		pat50	-49,75983	43,95120	1,000	-204,2188	104,6991
		pat51	4,80791	43,95120	1,000	-149,6510	159,2668

pat46	patOCA	-324,03001	43,95120	,000	-478,4889	-169,5711
	pat41	43,10140	43,95120	1,000	-111,3575	197,5603
	pat40	37,39100	43,95120	1,000	-117,0679	191,8499
	pat43	39,80628	43,95120	1,000	-114,6526	194,2652
	pat44	38,77869	43,95120	1,000	-115,6802	193,2376
	pat45	38,74397	43,95120	1,000	-115,7150	193,2029
	pat49	41,91058	43,95120	1,000	-112,5483	196,3695
	pat50	-11,01587	43,95120	1,000	-165,4748	143,4431
	pat51	43,55187	43,95120	1,000	-110,9070	198,0108
pat49	patOCA	-365,94059	43,95120	,000	-520,3995	-211,4817
	pat41	1,19082	43,95120	1,000	-153,2681	155,6497
	pat40	-4,51958	43,95120	1,000	-158,9785	149,9393
	pat43	-2,10430	43,95120	1,000	-156,5632	152,3546
	pat44	-3,13189	43,95120	1,000	-157,5908	151,3270
	pat45	-3,16662	43,95120	1,000	-157,6255	151,2923
	pat46	-41,91058	43,95120	1,000	-196,3695	112,5483
	pat50	-52,92645	43,95120	1,000	-207,3854	101,5325
	pat51	1,64129	43,95120	1,000	-152,8176	156,1002
pat50	patOCA	-313,01414	43,95120	,000	-467,4731	-158,5552
	pat41	54,11727	43,95120	1,000	-100,3417	208,5762
	pat40	48,40687	43,95120	1,000	-106,0521	202,8658
	pat43	50,82215	43,95120	1,000	-103,6368	205,2811
	pat44	49,79456	43,95120	1,000	-104,6644	204,2535
	pat45	49,75983	43,95120	1,000	-104,6991	204,2188
	pat46	11,01587	43,95120	1,000	-143,4431	165,4748
	pat49	52,92645	43,95120	1,000	-101,5325	207,3854
	pat51	54,56774	43,95120	1,000	-99,8912	209,0267
pat51	patOCA	-367,58188	43,95120	,000	-522,0408	-213,1230
	pat41	-,45047	43,95120	1,000	-154,9094	154,0084
	pat40	-6,16087	43,95120	1,000	-160,6198	148,2980
	pat43	-3,74559	43,95120	1,000	-158,2045	150,7133
	pat44	-4,77318	43,95120	1,000	-159,2321	149,6857
	pat45	-4,80791	43,95120	1,000	-159,2668	149,6510
	pat46	-43,55187	43,95120	1,000	-198,0108	110,9070
	pat49	-1,64129	43,95120	1,000	-156,1002	152,8176
	pat50	-54,56774	43,95120	1,000	-209,0267	99,8912

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Homogene Untergruppen

Transkriptmenge (relative Einheiten)				
	Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = 0.05.	
			1	2
Duncan ^a	pat51	5	1,0871	
	pat41	5	1,5376	
	pat49	5	2,7284	
	pat43	5	4,8327	
	pat44	5	5,8603	
	pat45	5	5,8950	
	pat40	5	7,2480	
	pat46	5	44,6390	
	pat50	5	55,6549	
	patOCA	5		368,6690
	Signifikanz		,299	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 5,000.

F6.3 Signifikanzanalyse Tabak zum Einfluss des Kodierbereich: *pat40*, *pat41*, *pat43*

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: $\mu\text{g PAT} / \text{g TSP}$

(I) Konstrukt		(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Obergrenze	Untergrenze
Bonferroni	pat41	pat40	-,72699	4,55701	1,000	-12,3586	10,9046
		pat43	-23,79097(*)	4,55701	,000	-35,4225	-12,1594
	pat40	pat41	,72699	4,55701	1,000	-10,9046	12,3586
		pat43	-23,06398(*)	4,55701	,000	-34,6956	-11,4324
	pat43	pat41	23,79097(*)	4,55701	,000	12,1594	35,4225
		pat40	23,06398(*)	4,55701	,000	11,4324	34,6956

* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

$\mu\text{g PAT} / \text{g TSP}$

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a	pat41	10	6,2855
	pat40	10	7,0125
	pat43	10	30,0765
Signifikanz		,874	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 10,000.

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Transkriptmenge (rE)

			Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Untergrenze				Obergrenze	
Bonferroni	pat41	pat40	-5,71040*	1,67490	,016	-10,3657	-1,0551
		pat43	-3,29512*	1,67490	,218	-7,95048	1,3602
	pat40	pat41	5,71040*	1,67490	,016	1,0551	10,3657
		pat43	2,41528	1,67490	,525	-2,2400	7,0706
	pat43	pat41	3,29512	1,67490	,218	-1,3602	7,9504
		pat40	-2,41528	1,67490	,525	-7,0706	2,2400

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

Transkriptmenge (rE)

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a	pat41	5	1,5376
	pat43	5	4,8327
	pat40	5	7,2480
Signifikanz		,073	,175

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 5,000.

F6.4 Signifikanzanalyse für Tabak zum Einfluss der 5'- und 3' UTR: *patOCA*, *pat44*, *pat45*

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: $\mu\text{g Pat} / \text{g TSP}$

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	patOCA	pat44	716,80955*	80,21140	,000	512,0733	921,5458
		pat45	722,56728*	80,21140	,000	517,8310	927,3036
	pat44	patOCA	-716,80955*	80,21140	,000	-921,5458	-512,0733
		pat45	5,75773	80,21140	1,000	-198,9786	210,4940
	pat45	patOCA	-722,56728*	80,21140	,000	-927,3036	-517,8310
		pat44	-5,75773	80,21140	1,000	-210,4940	198,9786

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

$\mu\text{g Pat} / \text{g TSP}$

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a pat45	10	24,5849	746,0048
pat44	10	29,1953	
patOCA	10		
Signifikanz		,943	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 10,000.

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Transkriptmenge [rE]

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	patOCA	pat44	362,80870*	78,28453	,002	145,2190	580,3984
		pat45	362,77397*	78,28453	,002	145,1842	580,3637
	pat44	patOCA	-362,80870*	78,28453	,002	-580,3984	-145,2190
		pat45	-,03473	78,28453	1,000	-217,6245	217,5550
	pat45	patOCA	-362,77397*	78,28453	,002	-580,3637	-145,1842
		pat44	,03473	78,28453	1,000	-217,5550	217,6245

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

Transkriptmenge (rE)

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a pat44	5	5,8603	368,6690
pat45	5	5,8950	
patOCA	5		
Signifikanz		1,000	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 5,000.

F6.5 Signifikanzanalyse für Tabak zum Einfluss des Terminator: *patOCA*, *pat46*, *pat49*

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: $\mu\text{g Pat} / \text{g TSP}$

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	patOCA	pat46	704,45605*	80,22584	,000	499,6829	909,2292
		pat49	738,35590*	80,22584	,000	533,5828	943,1290
	pat46	patOCA	-704,45605*	80,22584	,000	-909,2292	-499,6829
		pat49	33,89985	80,22584	1,000	-170,8733	238,6730
	pat49	patOCA	-738,35590*	80,22584	,000	-943,1290	-533,5828
		pat46	-33,89985	80,22584	1,000	-238,6730	170,8733

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

$\mu\text{g Pat} / \text{g TSP}$

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a pat49	10	7,6489	746,0048
pat46	10	41,5488	
patOCA	10		
Signifikanz		,676	

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 10,000.

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Transkriptmenge [rE]

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	patOCA	pat46	324,03001*	79,66837	,005	102,5939	545,4661
		pat49	365,94059*	79,66837	,002	144,5045	587,3767
	pat46	patOCA	-324,03001*	79,66837	,005	-545,4661	-102,5939
		pat49	41,91058	79,66837	1,000	-179,5255	263,3467
	pat49	patOCA	-365,94059*	79,66837	,002	-587,3767	-144,5045
		pat46	-41,91058	79,66837	1,000	-263,3467	179,5255

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

Transkriptmenge (rE)

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a pat49	5	2,7284	368,6690
pat46	5	44,6390	
patOCA	5		
Signifikanz		,608	

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 5,000.

F6.6 Signifikanzanalyse für Tabak zum Einfluss des Terminator: *pat50*, *pat51*, *pat43*

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: µg Pat / g TSP

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	pat43	pat50	-495,15018*	61,73188	,000	-652,7183	-337,5821
		pat51	29,64800	61,73188	1,000	-127,9201	187,2161
	pat50	pat43	495,15018*	61,73188	,000	337,5821	652,7183
		pat51	524,79818*	61,73188	,000	367,2301	682,3663
	pat51	pat43	-29,64800	61,73188	1,000	-187,2161	127,9201
		pat50	-524,79818*	61,73188	,000	-682,3663	-367,2301

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

µg Pat / g TSP

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a pat51	10	,4285	525,2267
pat43	10	30,0765	
pat50	10		
Signifikanz		,635	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 10,000.

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Transkriptmenge [rE]

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	pat43	pat50	-50,82215*	9,39102	,000	-76,9242	-24,7201
		pat51	3,74559	9,39102	1,000	-22,3565	29,8477
	pat50	pat43	50,82215*	9,39102	,000	24,7201	76,9242
		pat51	54,56774*	9,39102	,000	28,4656	80,6698
	pat51	pat43	-3,74559	9,39102	1,000	-29,8477	22,3565
		pat50	-54,56774*	9,39102	,000	-80,6698	-28,4656

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

Transkriptmenge (rE)

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.	
		1	2
Duncan ^a pat51	5	1,0871	55,6549
pat43	5	4,8327	
pat50	5		
Signifikanz		,697	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 5,000.

F6.7 Signifikanzanalyse für Kartoffel (alle Konstrukte): ProteinPat / TSP ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: $\mu\text{gPAT/gTSP}$

	(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Obergrenze	Untergrenze
Bonferroni	patOCA	pat41	106,93333(*)	19,14082	,000	44,5652	169,3014
		pat40	104,57133(*)	16,57644	,000	50,5590	158,5837
		pat43	86,39183(*)	16,57644	,000	32,3795	140,4042
		pat44	77,73717(*)	16,57644	,001	23,7248	131,7495
		pat45	63,51867(*)	16,57644	,012	9,5063	117,5310
	pat41	patOCA	-106,93333(*)	19,14082	,000	-169,3014	-44,5652
		pat40	-2,36200	16,57644	1,000	-56,3744	51,6504
		pat43	-20,54150	16,57644	1,000	-74,5539	33,4709
		pat44	-29,19617	16,57644	1,000	-83,2085	24,8162
		pat45	-43,41467	16,57644	,226	-97,4270	10,5977
	pat40	patOCA	-104,57133(*)	16,57644	,000	-158,5837	-50,5590
		pat41	2,36200	16,57644	1,000	-51,6504	56,3744
		pat43	-18,17950	13,53460	1,000	-62,2804	25,9214
		pat44	-26,83417	13,53460	,885	-70,9351	17,2667
		pat45	-41,05267	13,53460	,086	-85,1536	3,0482
	pat43	patOCA	-86,39183(*)	16,57644	,000	-140,4042	-32,3795
		pat41	20,54150	16,57644	1,000	-33,4709	74,5539
		pat40	18,17950	13,53460	1,000	-25,9214	62,2804
		pat44	-8,65467	13,53460	1,000	-52,7556	35,4462
		pat45	-22,87317	13,53460	1,000	-66,9741	21,2277
	pat44	patOCA	-77,73717(*)	16,57644	,001	-131,7495	-23,7248
		pat41	29,19617	16,57644	1,000	-24,8162	83,2085
		pat40	26,83417	13,53460	,885	-17,2667	70,9351
		pat43	8,65467	13,53460	1,000	-35,4462	52,7556
		pat45	-14,21850	13,53460	1,000	-58,3194	29,8824
	pat45	patOCA	-63,51867(*)	16,57644	,012	-117,5310	-9,5063
		pat41	43,41467	16,57644	,226	-10,5977	97,4270
		pat40	41,05267	13,53460	,086	-3,0482	85,1536
		pat43	22,87317	13,53460	1,000	-21,2277	66,9741
		pat44	14,21850	13,53460	1,000	-29,8824	58,3194

* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Homogene Untergruppen

$\mu\text{g PAT / g TSP}$

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = .05.		
		2	3	1
Duncan ^{a,b}	pat41	3	1,5013	
	pat40	6	3,8633	
	pat43	6	19,6828	19,6828
	pat44	6	30,6975	30,6975
	pat45	6		44,9160
	patOCA	3		108,4347
	Signifikanz		,099	,179

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 4,500.

b Die Gruppengrößen sind nicht identisch. Es wird das harmonische Mittel der Gruppengrößen verwendet. Fehlerniveaus des Typs I sind nicht garantiert.

F6.8 Signifikanzanalyse für Kartoffel (alle Konstrukte): RNA (relative Einheiten)

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: rE Transkriptmenge

					95%-Konfidenzintervall		
(I) Konstrukt	(J) Konstrukt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	Untergrenze	Obergrenze	
Bonferroni	patOCA	pat41	54,73780	5,64088	,000	35,6696	73,8060
		pat40	47,65658	5,27656	,000	29,8199	65,4933
		pat43	46,69333	5,27656	,000	28,8566	64,5300
		pat44	50,57583	5,27656	,000	32,7391	68,4125
		pat45	43,85000	4,88515	,000	27,3364	60,3636
	pat41	patOCA	-54,73780	5,64088	,000	-73,8060	-35,6696
		pat40	-7,08122	5,27656	1,000	-24,9179	10,7555
		pat43	-8,04447	5,27656	1,000	-25,8812	9,7922
		pat44	-4,16197	5,27656	1,000	-21,9987	13,6747
		pat45	-10,88780	4,88515	,582	-27,4014	5,6258
	pat40	patOCA	-47,65658	5,27656	,000	-65,4933	-29,8199
		pat41	7,08122	5,27656	1,000	-10,7555	24,9179
		pat43	-,96325	4,88515	1,000	-17,4768	15,5503
		pat44	2,91925	4,88515	1,000	-13,5943	19,4328
		pat45	-3,80658	4,45951	1,000	-18,8813	11,2682
	pat43	patOCA	-46,69333	5,27656	,000	-64,5300	-28,8566
		pat41	8,04447	5,27656	1,000	-9,7922	25,8812
		pat40	-,96325	4,88515	1,000	-15,5503	17,4768
		pat44	3,88250	4,88515	1,000	-12,6311	20,3961
		pat45	-2,84333	4,45951	1,000	-17,9181	12,2314
	pat44	patOCA	-50,57583	5,27656	,000	-68,4125	-32,7391
		pat41	4,16197	5,27656	1,000	-13,6747	21,9987
		pat40	-2,91925	4,88515	1,000	-19,4328	13,5943
		pat43	-3,88250	4,88515	1,000	-20,3961	12,6311
		pat45	-6,72583	4,45951	1,000	-21,8006	8,3489
	pat45	patOCA	-43,85000	4,88515	,000	-60,3636	-27,3364
		pat41	10,88780	4,88515	,582	-5,6258	27,4014
		pat40	3,80658	4,45951	1,000	-11,2682	18,8813
		pat43	2,84333	4,45951	1,000	-12,2314	17,9181
		pat44	6,72583	4,45951	1,000	-8,3489	21,8006

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Homogene Untergruppen

Transkriptmenge (rE)

Konstrukt	N	Untergruppe für Alpha = 0.05.	
		1	2
Duncan ^{a,b}			
pat41	3	1,4755	
pat44	4	5,6375	
pat40	4	8,5568	
pat43	4	9,5200	
pat45	6	12,3633	
patOCA	3		56,2133
Signifikanz		,065	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a. Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 3,789.

b. Die Gruppengrößen sind nicht identisch. Es wird das harmonische Mittel der Gruppengrößen verwendet. Fehlerniveaus des Typs I sind nicht garantiert.

F7Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Vergleichende Darstellung der untersuchten <i>pat</i> Konstrukte.....	27
Abb. 2	Schema des Versuchsaufbaus.....	28
Abb. 3	Vergleich der <i>pat</i> Expressionsmuster der analysierten <i>pat</i> Gene in Tabak.....	29
Abb. 4	Durchschnittliche <i>pat</i> mRNA ‘steady state level’ für alle <i>pat</i> Gene.....	30
Abb. 5	Durchschnittliche Protein ‘steady state level’ für alle <i>pat</i> Gene.....	31
Abb. 6	Zusammensetzung des <i>pat40</i> -, <i>pat41</i> - und <i>pat43</i> Gens (A), Sequenzvergleich ihrer 3’ UTRs (B), sowie Western Blot von repräsentativen Vertretern (C).....	32
Abb. 7	Einfluss des Kodierbereichs auf die <i>pat</i> Expression.....	33
Abb. 8	Zusammensetzung des <i>patOCA</i> - und <i>pat44</i> Gens, Sequenz des 5’ UTRS und 5’ UTR41 und deren Einfluss auf die Expression.....	35
Abb. 9	Überblick über die verschiedenen 5’ Bereiche des 3’ UTR.....	37
Abb. 10	Einfluss der verschiedenen 5’ Bereiche des 3’ UTRs auf das Expressionslevel.....	37
Abb. 11	Überblick über die verschiedenen 5’ Bereiche des 3’ UTRs für <i>pat</i> Gene, die sich in ihren Transkriptionsterminatoren unterscheiden.....	39
Abb. 12	Einfluss der verschiedenen Transkriptionsterminatoren auf die Expression.....	40
Abb. 13	Charakterisierung der <i>pat</i> 3’ Transkriptenden in verschiedenen <i>pat</i> Pflanzen, die den 3’ <i>camv</i> bzw. den 3’ <i>camv</i> reverse enthalten.....	42
Abb. 14	Charakterisierung der <i>pat</i> 3’ Transkriptenden in verschiedenen <i>pat</i> Pflanzen, die den 3’ <i>nos</i> enthalten.....	44
Abb. 15	Einfluss der Kopienzahl auf das <i>pat</i> Expressionslevel für <i>pat46</i> Linien.....	47
Abb. 16	Einfluss der UTR Sequenzen auf die <i>pat</i> mRNA Stabilität	49
Abb. 17	Bestimmung der <i>pat51</i> mRNA Halbwertszeit in den <i>pat51</i> Linien 3 (A) und 12 B)....	50
Abb. 18	Vergleich der <i>pat</i> Expressionsmuster der analysierten <i>pat</i> Gene in Kartoffel.....	52
Abb. 19	Durchschnittliche <i>pat</i> mRNA- und Protein ‘steady state level’ für alle <i>pat</i> Gene in Kartoffel.....	52
Abb. 20	Southern Blot Analyse zur Ermittlung der Kopienzahl verschiedener transgener Kartoffel-Events.....	53
Abb. 21	Einfluss der Kopienzahl auf das Pat-ProteinExpressionslevel für <i>pat44</i> - und <i>pat45.2</i> Events.....	54
Abb. 22	Relative Pat Protein- und mRNA Gehalte für 5 <i>pat44</i> Linien unter Kontroll- und Hitzestressbedingungen in der T ₀ -Generation.....	58
Abb. 23	Enzymaktivitätstests von jeweils 8 Geschwistern der Linien <i>pat44</i> -1.4 (A), -4.5.(B) und -4.4.(C).....	59

Abb. 24	Expressionsmuster verschiedener <i>pat45.1</i> - und <i>pat45.2</i> Linien.....	60
Abb. 25	Enzymaktivitätstest von einigen <i>pat46</i> Linien der T ₀ - und T ₁ -Generation, sowie Northern Blot an verschiedenen Geschwistern der Linien 43 und 62 der T ₁	62
Abb. 26	Relative mRNA Gehalte unter Hitzestressbedingungen für jeweils 4 unabhängige <i>pat40</i> -, <i>pat41</i> - und <i>pat43</i> Linien.....	64
Abb. 27	Relative mRNA Gehalte unter Hitzestressbedingungen für Linie <i>pat50-33</i> und <i>pat45-58</i>	65
Abb. 28	mRNA Halbwertszeit unter Hitzestressbedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen für die instabile <i>pat50</i> Linie 33 und die stabile <i>pat45</i> Linie 58.....	65
Abb. 29	Isolierung kleiner RNAs aus den Linien <i>pat41-156</i> , 8 und 15 sowie der niK SRI.....	66
Abb. 30	Schematische Darstellung des Hybridisierungsbereichs der <i>pat41</i> -Sonde.....	67
Abb. 31	Größenstandards für den Nachweis kleiner RNAs mittels Northern Blot Analys.....	67
Abb. 32	Northern Blot Analyse zum Nachweis kleiner RNAs.....	68
Abb. 33	Einfluss der Kopienzahl auf die <i>pat</i> Expression unter Hitzestress bei einigen <i>pat46</i> Linien.....	70
Abb. 34	Einfluss der Kopienzahl auf die <i>pat</i> Expression bei 37 °C zwischen Geschwistern der <i>pat44</i> Linie 5.89.....	71
Abb. 35	Relative mRNA- und Protein ‘steady state level’ für einige <i>pat</i> Events unter Hitzestress.....	73
Abb. 36	Einfluss des Hitzestresses auf die <i>pat40</i> -Transkriptlängen verschiedener Kartoffelevents.....	74
Abb. 37	Überblick des Testsystems zur Untersuchung der systemischen Ausbreitung des durch Hitzebehandlung ausgelösten Inaktivierungssignals in transgenen <i>pat41</i> - und <i>pat43</i> Tabakpflanzen.	75
Abb. 38	Abhängigkeit des TSP vom Entwicklungsstand des Blattes (Mittlung aus 3 isogenen Pflanzen der Linie 156).....	76
Abb. 39	Pat-ELISA (A) und Enzymaktivitätstest (B) der Pflanze <i>pat41-156-1</i>	77
Abb. 40	Enzymaktivitätstests der Signaltransfer- und isogenen Kontrollpflanze <i>pat41-84-1</i>	78
Abb. 41	Phänotypischer Test zur Pt-Resistenz nach Pt-Tropfapplikation auf Blättern der Tabakpflanze <i>pat41-84-1</i> nach 7-tägiger Hitzebehandlung eines Blattes, und auf Blättern einer ungestressten, isogenen Kontrollpflanze.....	79
Abb. 42	Analyse der Transgenexpression aller Blätter einer <i>pat43-7</i> Tabakpflanze, bei der ein Blatt für 20 Tage bei 37 °C inkubiert wurde, sowie einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze.....	80
Abb. 43	Fotographische Aufnahme der Testpflanze <i>pat43-7</i> , dessen HB-Blatt nur zur Hälfte für 7 d bei 37 °C inkubiert wurde.....	81

Abb. 44	Western Blot und Enzymaktivitätstest für alle Blätter einer <i>pat43-7</i> -Pflanze, bei der ein Blatt zur Hälfte 7 d bei 37 °C inkubiert wurde, sowie einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze82
Abb. 45	Quantifizierung der <i>pat</i> mRNA- (A) und des Pat Proteingehalte (B) der Blätter der Tabakpflanze <i>pat43-7</i> , bei der ein Blatt zur Hälfte 7 d bei 37 °C inkubiert wurde, sowie einer isogenen, ungestressten Kontrollpflanze.....83
Abb. D1	Potentielle mRNA-Sekundärstrukturen der <i>patOCA</i> -, <i>pat44</i> -, <i>pat45</i> - und <i>pat47</i> mRNA berechnet mit Mfold 2.3 (Zuker, 2003) beginnend mit dem 5' UTR und endend mit der Major Cleavage Site (CS) des 3' <i>camv</i> , sowie Ausschnitt des 5' Bereichs. Translationsstart und -stopp sind markiert.....87
Abb. D2	Potentielle mRNA-Sekundärstrukturen für die <i>patOCA</i> -, <i>pat44</i> -, <i>pat45</i> - und <i>pat47</i> mRNA bei 37 °C.....109

F8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendeter Bakterienstamm.....8
Tabelle 2	Verwendeter Pflanzentransformationsvektor.....8
Tabelle 3	Antibiotikazusätze.....9
Tabelle 4	Pat Konzentrationen von 10 unabhängigen <i>pat46</i> Linien in der T ₀ - und T ₁ -Generation.....31
Tabelle 5	Umsatzrate der <i>pat</i> mRNA in das Pat Protein.....36
Tabelle 6	Inter-Transformant-Variabilität für die <i>pat</i> Konstrukte im Pat Protein 'steady state level'45
Tabelle 7	Intra-Transformant-Variabilität im Pat Protein 'steady state level' für verschiedene <i>pat</i> Linien.....46
Tabelle 8	Intra-Transformant-Variabilität im Protein 'steady state level' einiger Kartoffelevents.....54
Tabelle 9	Inter-Transformant-Variabilität im Protein 'steady state level' aller <i>pat</i> Gene in Kartoffel.....55
Tabelle 10	Pat Proteinkonzentrationen der unter Hitzestress inaktivierenden <i>pat</i> Linien.....69
Tabelle 11	GC-Gehalte der unterschiedliche <i>pat</i> Kodierbereiche im Vergleich zu endogenen Tabak- und Kartoffelgenen.....85

F9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
ACB	ACB-Kallusinduktionsmedium
ActD	Aktinomycin D
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
6-BAP	6-Benzylaminopurin
<i>bar</i>	Bialaphosresistenzgen aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
¹⁴ C	radioaktives Kohlenstoffatom
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus ('Cauliflower Mosaic Virus')
cDNA	'copy' DNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
d. h.	das heißt
D,L-Pt	Phosphonhthricin-Racemat, 1:1 Gemisch des D- und L-Enantiomers
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence of Luminol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
et al.	et alii, und andere
fw	'forward'
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunden
HB	Hitze-behandeltes Blatt (37°C)
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IR	'Inverted Repeat' (umgekehrte Wiederholung)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Km	Kanamycin
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	'Left Border' (linke Grenze der T-DNA)
LS-Medium	Pflanzenmedium nach Linsmaier & Skoog (1965)

Lsg.	Lösung
<i>luc</i>	Luziferase-Gen aus <i>Photinus pyralis</i>
LUC	vom <i>luc</i> Gen kodierte Protein Luziferase
M	Molar(-ität)
mA	Milliampère
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethan-Sulfonat
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	‘microRNA’
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino-)-propansulfonsäure
mRNA	‘messenger-RNA’
MS-Medium	Pflanzenmedium nach Murashige & Skoog (1962)
MW	‘molecular weight’ (Molekulargewicht)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin
n	nano (10 ⁻⁹)
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>N</i> -Ac-Pt	<i>N</i> -Acetyl-Phosphinothricin
Na	Natrium
NAA	α-Naphtalenessigsäure
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer
<i>nos</i>	Nopalinsynthasegen (Bevan et al., 1983)
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferasegen (aus dem Tn5; Herrera-Estrella et al., 1983)
<i>ocs</i>	Octopinsynthasegen (De Greve et al., 1982)
OD	optische Dichte
p	Plasmid
p35S	Promotor des 35S-RNA-Gens aus dem Blumenkohlmosaikvirus
p35S ₅₃₄	534 bp-Promotor des 35S-RNA-Gens aus dem Blumenkohlmosaikvirus
p35S ₈₂₃	823 bp-Promotor des 35S-RNA-Gens aus dem Blumenkohlmosaikvirus
pNos	Promotor des Nopalinsynthasegens aus <i>A. tumefaciens</i> (Bevan et al., 1983)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pat	Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferase
<i>pat</i>	Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferasegen aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
<i>pat41</i>	Kodierbereich des natürlichen Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferasegens
<i>patS</i>	Kodierbereich des synthetischen Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferasegens
PCR	‘Polymerase Chain Reaction’ (Polymerasekettenreaktion)
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pt	L-Phosphinothricin
PTGS	‘post-transcriptional gene silencing’ (Post-transkriptionelle Geninaktivierung)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvenypyrrolidon
R	Resistenz
RB	‘Right Border’ (rechte Grenze der T-DNA)
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
rev o. rv	‘reverse’
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
s	Sekunden
SAUR	‘small auxin-upregulated RNA’
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	‘small interfering RNA’
Sm	Streptomycin
Sm/Sp ^R	<i>aadA</i> -Markergen, das eine Resistenz gegen Streptomycin und Spektinomycin vermittelt (Stockhaus et al., 1987)
Sp	Spektinomycin
SRI	<i>Nicotiana tabacum</i> Wildtyp der Sorte Petit Havana
SSC	Standard Sodiumcitrate
T	Thymin
TC	Translations-Stoppcodon
T ₀	erste Generation (Primärtransformante)
T ₁	erste Tochtergeneration
TA	Tris-Acetat-Puffer
Tab.	Tabelle
TB	Tris-Borat-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TGS	‘transcriptional gene silencing’ (transkriptionelle Geninaktivierung)
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
U	‘Units’ (Enzymeinheiten)
u. a.	unter anderen
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
3′ <i>camv</i>	Terminator des 35S-rRNA-Gens aus dem Blumenkohlmosaikvirus
3′ <i>nos</i>	Terminator des Nopalinsynthasegens aus <i>A. tumefaciens</i>
3′ <i>ocs</i>	Terminator des Octopinsynthasegens aus <i>A. tumefaciens</i>
3′ UTR41	3′ untranslatierte Region des <i>pat41</i> Gens
5′ UTR 41	5′ untranslatierte Region des <i>pat41</i> Gens
3′ UTRS	3′ untranslatierte Region des <i>patOCA</i> Gens
5′ UTRS	5′ untranslatierte Region des <i>patOCA</i> Gens
3′ UTR43	3′ untranslatierte Region des <i>pat43</i> Gens
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
3′	3′-OH-Ende
5′	5′-Phosphat-Ende
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent